

Ana-Marija Plećaš

**Antioksidacijsko djelovanje etanolnih ekstrakata
odabranih vrsta roda *Juniperus***

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmakognozija 1 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmakognoziju pod stručnim vodstvom više asistentice-poslijedoktorandice dr. sc. Marije Kindl.

Zahvaljujem se mentorici dr. sc. Mariji Kindl što mi je pomogla pri odabiru teme za diplomski rad te na savjetima, razumijevanju i stručnom vodstvu tijekom izrade istog.

Posebno hvala mojoj obitelji na neizmjernoj podršci i pomoći pruženoj tijekom cijelog studija.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Botanička obilježja vrsta roda <i>Juniperus</i> L.	2
1.1.1. <i>Juniperus communis</i> L.	3
1.1.2. <i>Juniperus oxycedrus</i> L.	4
1.1.3. <i>Juniperus phoenicea</i> L.	5
1.2. Pregled dosadašnjih istraživanja polifenola vrsta <i>J. oxycedrus</i> i <i>J. phoenicea</i>	6
1.3. Polifenoli kao bioaktivne sastavnice roda <i>Juniperus</i>	10
1.4. Oksidacijski stres i antioksidansi	12
2. OBRAZLOŽENJE TEME	13
3. MATERIJALI I METODE	15
3.1. Materijali	16
3.1.1. Istraživani biljni materijal	16
3.1.2. Instrumenti i pribor	16
3.1.3. Reagensi, standardi i ostale kemikalije	17
3.2. Istraživanje polifenolnih sastavnica metodom tankoslojne kromatografije visoke djelotvornosti (HPTLC)	18
3.2.1. Priprema uzoraka i standarda	18
3.2.2. Ispitivanje flavonoida	18
3.2.3. Ispitivanje trjeslovina	18
3.3. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja polifenola	19
3.3.1. Određivanje flavonoida	19
3.3.2. Određivanje ukupnih polifenola i trjeslovina	20
3.3.3. Određivanje procijanidina	21
3.4. Istraživanje antioksidacijskog djelovanja	23
3.4.1. Priprema uzoraka i standarda	23
3.4.2. Određivanje sposobnosti hvatanja DPPH slobodnog radikala	23
3.4.3. Određivanje sposobnosti redukcije iona željeza(III)	24
3.4.4. Određivanje sposobnosti keliranja iona željeza(II)	25
3.5. Statistička analiza	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. HPTLC karakterizacija polifenolnih sastavnica	27

4.1.1. Flavonoidi	27
4.1.2. Trjeslovine	31
4.2. Sadržaj polifenolnih sastavnica određen spektrofotometrijskim metodama.....	32
4.2.1. Flavonoidi	32
4.2.2. Ukupni polifenoli i trjeslovine	32
4.2.3. Procijanidini	33
4.2.4. Usporedni prikaz sadržaja polifenola	34
4.3. Antioksidacijsko djelovanje	35
4.3.1. Sposobnost hvatanja DPPH radikala.....	35
4.3.2. Redukcijska sposobnost	37
4.3.3. Kelirajuća aktivnost.....	39
4.3.4. Usporedna antioksidacijska aktivnost etanolnih ekstrakta vrsta roda <i>Juniperus</i>	41
5. ZAKLJUČCI	42
6. LITERATURA	44
7. SAŽETAK/SUMMARY	49
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD



Ljekovitost vrsta roda *Juniperus* L. poznata je u narodnoj i suvremenoj medicini. Jedina službeno priznata ljekovita vrsta tog roda je vrsta *Juniperus communis* L.. Stari rimski zapisi govore o upotrebi borovice u obliku vina za poticanje diureze. Danas se u farmaciji zbog svog ljekovitog djelovanja koriste osušene zrele smrekinje vrste *J. communis* koje čine drogu Juniperi galbulus officinalnu u Europskoj farmakopeji. Droga sadrži 0,8-2% eteričnog ulja koje također ima svoju monografiju u Europskoj farmakopeji (Juniperi aetheroleum), a karakterizira ga prisutnost monoterpena (α -pinen, limonen i mircen). Osim eteričnog ulja smrekinje sadrže i 30% invertnog šećera, 3-5% trjeslovina, flavonoide i diterpenske kiseline. U suvremenoj fitoterapiji indicirana je primjena ovih droga kod blagih urinarnih tegoba za poticanje diureze te kod probavnih tegoba dispepsije i nadutosti. Za diuretsko djelovanje odgovorne su terpenke molekule koje svoj učinak temelje na hiperemiji glomerula (iritacija) (EMA/HMPC, 2010; EMA/HMPC, 2008; Wichtl, 2004). Znanstvenim je istraživanjima također utvrđeno da borovica djeluje hipoglikemijski, antimikrobno, protuupalno i antioksidacijski (Fierascu i sur., 2018; EMA/HMPC, 2008). Budući da dosadašnje znanstvene spoznaje upućuju na veliki biomedicinski potencijal vrsta roda *Juniperus*, u okviru ovog diplomskog rada istražene su odabrane vrste tog roda koje rastu u Hrvatskoj.

1.1. Botanička obilježja vrsta roda *Juniperus* L.

Rod *Juniperus* L. pripada porodici Cupressaceae, a čine ga zimzelena drvenasta stabla ili grmovi. Dvodomne ili jednodomne biljke. Listovi su nasuprotni ili skupljeni po 3 u pršljenu, igličasti ili ljuskavi (mladi listovi uvijek igličasti, dok su kod odraslih biljaka najčešće ili svi ljuskavi ili svi igličasti). Češer sazrijeva prvu, drugu ili treću godinu, obično je okruglast, nalik na bobu. Bobičasti češer sadrži 1-12 jajolikih ili duguljastih sjemenki (Tutin i sur., 1972).

1.1.1. *Juniperus communis* L.

Obična borovica je vazdazeleni grm ili stablo uspravnog rasta, visoko do 15 m (Slika 1). Listovi su dugi 10-20 mm, kruti, linearno bodljasti, strše, pri dnu odijeljeni, skupljeni po 3 u pršljenu, bez smolaste žlijezde. S gornje strane su plitko žlijebasti, s donje strane tupo hrptasti, a na licu imaju bijelu prugu. Dvodomna je biljka, ženska jedinka nosi ženske češere koji se sastoje od 3 sjemena zametka smještene na 3 plodnička lista, a obavijena su velikim brojem sterilnih ovojnih listova. Na muškoj se jedinki razvijaju muški češeri koji su građeni od brojnih ljuskastih prašničkih listova koji nose 3-4 peludnice. Na donjem dijelu osi muškog češera poredani su ljuskasti ovojni listovi. Cvate od travnja do lipnja. Oprašuje se vjetrom, a nakon oplodnje, iz 3 sjemena zametka razvijaju se 3 sjemenke, a 3 plodna lista srastu u mesnati ovoj pri čemu nastaje bobičasti češer (galbulus ili smrekinja). Češeri su okruglasti, promjera do 10 mm, a sazrijevaju u drugoj ili trećoj godini. Prvu godinu su zeleni, a kad sazriju su plavocрни. Na gornjoj strani uočljiv je trokraki šav nastao sraštavanjem plodničkih listova (Wichtl, 2004; Domac, 2002; Tutin i sur., 1972).

U Hrvatskoj ova biljka veoma je rasprostranjena u kopnenom podnožju velebitskog brdskog masiva. Raste u šikarama, na zapuštenim pašnjacima i travnjacima, ali i na kamenitim staništima (Forenbacher, 1990).



Slika 1. *Juniperus communis* L. (preuzeto s <http://www.euforgen.org/>)

1.1.2. *Juniperus oxycedrus* L.

Oštroigličasta borovica u narodu poznata kao primorska šmrika ili smrič je grm ili drvo visoko do 14 m (Slika 2). Naziv vrste potječe od grčke riječi *oxys* što u prijevodu znači bodljikav, dok *cedros* označava stablo. Krošnja je obično okruglasta, odrasle grane tvrde, a grančice bridaste. Listovi su dugi 15-20 mm, te su kao i kod obične borovce igličasti, strše, pri dnu odijeljeni, po 3 u pršljenu, bez smolaste žlijezde. S gornje strane imaju dvije odvojene bijele pruge, a s donje strane su oštro hrptasti. Često su žućkastozeleni s po više bobičastih češera zajedno. Dvodomna je biljka koja cvate u travnju i svibnju. Češer dozrijeva u drugoj godini i nosi po 3 duguljaste sjemenke. Sastavljen je od 3-6 sraslih ljustaka. Oblikom je okruglast do obrnuto jajast, promjera 6-15 mm, u početku zelene boje, no kad je zreo poprima crvenkasto-smeđu boju i sjaj (Kovačević, 2008; Domac, 2002; Forenbacher, 1990; Tutin i sur., 1972).

Submediteranska i mediteranska vrsta, karakteristična za kamenjarske travnjake, bušike i makiju i manje šume. Prodire i duboko u kopno, gdje raste na toplim staništima. Mjestimično je veoma rasprostranjena tvoreći glavni sastav zimzelenog raslinja (Kovačević, 2008; Forenbacher, 1990).



Slika 2. *Juniperus oxycedrus* L. (preuzeto s <https://www.plantea.com.hr/>)

1.1.3. *Juniperus phoenicea* L.

Fenička borovica poznata pod nazivom primorska somina ili gluhač je gusti grm ili nisko stablo visine do 8 m (Slika 3). Krošnja je okruglasto piramidalna, grane su brojne, isprepletene i izvijene na sve strane, a grančice duge i tanke. Mladi listovi su igličasti s malim oštrim vrhom i dvije pruge s obje strane, većinom su po 3 u pršljenu. Listovi odraslih biljaka ljuskasti, jajoliko-romboidni, tupi, prilegnuti uz grane. Često imaju smolastu žlijezdu na gornjoj strani. Fenička borovica je jednodomna, rijetko dvodomna biljka. Cvate od veljače do travnja. Bobičasti češer je okruglast, promjera 8-14 mm, sastavljen od 6-8 međusobno sraslih plodnih listića te sadrži 3-9 jajastih sjemenki. Sazrijeva u drugoj godini, a u zreloj fazi je sjajan, crvenkastosmeđe ili žućkastosmeđe boje (Kovačević, 2008; Domac, 2002; Tutin i sur., 1972).

Raste najčešće u obalnom, eumediteranskom vazdazelenom području, u sastavu kamenjarskih travnjaka, bušika i makije. U Hrvatskoj prevladava u Kvarnerskom primorju, sjevernoj, srednjoj i južnoj Dalmaciji (Kovačević, 2008).



Slika 3. *Juniperus phoenicea* L. (preuzeto s <https://www.plantea.com.hr/>)

1.2. Pregled dosadašnjih istraživanja polifenola vrsta *J. oxycedrus* i *J. phoenicea*

El Jemli i sur. (2016) su istražili antiradikalnu aktivnost i redukcijsku sposobnost vodenih ekstrakata listova odabranih vrsta roda *Juniperus* sakupljenih u Maroku, među kojima su bile i vrste *J. oxycedrus* i *J. phoenicea*. Najbolju sposobnost hvatanja slobodnih radikala (DPPH i ABTS) kao i redukcije željeza pokazao je ekstrakt vrste *J. oxycedrus* s IC₅₀ vrijednostima od 18 µg/mL do 24 µg/mL. Utvrđena je snažna korelacija između antioksidacijskog djelovanja i sadržaja ukupnih fenola i flavonoida, što ukazuje da ovi sekundarni metaboliti značajno doprinose aktivnosti ovih *Juniperus* ekstrakata.

Ispitan je fitokemijski sastav, antioksidacijsko i protuupalno djelovanje polarnih ekstrakata vrste *J. oxycedrus* subsp. *macrocarpa* sakupljene na Hvaru. Antioksidacijski učinak je procijenjen ispitivanjem sposobnosti hvatanja DPPH, hidroksilnog i superoksidnog radikala, dušikovog oksida te redukcije iona željeza i inhibicije lipidne peroksidacije. Bolju antioksidacijsku aktivnost je pokazao ekstrakt listova i grančica, dok je ekstrakt smrekinja ostvario najbolji protuupalni učinak na temelju povećanja stvaranja prostaglandina PGE₂. LC-MS/MS analizom je utvrđeno da su u ekstraktima najzastupljenije polifenolne sastavnice flavonoidi. Rutin, katehin, kvercitrin i epikatehin su bili glavni polifenoli u ekstraktu listova i grančica dok je u smrekinjama najveći udio određene za amentoflavon, apigenin i rutin (Lesjak i sur., 2014).

Taviano i sur. (2013) su ispitali antioksidacijski, citotoksični i antimikrobni učinak metanolnih ekstrakata zrelih smrekinja dviju podvrsta *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus* i *J. oxycedrus* subsp. *macrocarpa* iz turske flore. Ekstrakt vrste *J. oxycedrus* subsp. *macrocarpa* je pokazao bolju sposobnost hvatanja DPPH radikala i inhibicije lipidne peroksidacije, dok je za vrstu *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus* ustanovljena bolja kelirajuća aktivnost i redukcijska moć. Istraživani ekstrakti su djelovali bakteriostatski na testirane Gram-pozitivne bakterijske sojeve. Kupresoflavon i amentoflavon su bili glavni polifenoli u ispitivanim ekstraktima (HPLC-DAD-ESI-MS).

Istraženo je antioksidacijsko djelovanje vodeno-metanolnih ekstrakata listova i kore korijenja vrste *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus*. Aktivnost je procijenjena ispitivanjem sposobnosti hvatanja DPPH i ABTS radikala, redukcije željeza, u sustavu β-karoten-linolna kiselina te određivanjem ukupnog antioksidacijskog kapaciteta. Usporedbom dobivenih IC₅₀ vrijednosti utvrđena je bolja antioksidacijska aktivnost za ekstrakt kore korijenja iako je u ekstraktu

listova određen veći sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i trjeslovina (Chaouche i sur., 2013).

Öztürk i sur. (2011) su proveli usporedno istraživanje bioloških učinaka različitih ekstrakata smrekinja šest vrsta roda *Juniperus* iz turske flore. Ispitali su antioksidacijsko i antimikrobno djelovanje te učinke na aktivnost enzima acetilkolinesteraze (AChE) i butirilkolinesteraze (BChE). U sustavu β -karoten-linolna kiselina acetonski ekstrakt vrste *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus* i metanolni ekstrakt vrste *J. phoenicea* su učinkovito inhibirali oksidaciju linolne kiseline s IC₅₀ vrijednostima 31 μ g/mL i 36 μ g/mL. Najbolju sposobnost inhibicije AChE i BChE su pokazali heksanski ekstrakti vrsta *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus* i *J. phoenicea* ostvarujući učinak iznad 75 % pri koncentraciji od 200 μ g/mL. Dobra antioksidacijska svojstva su ukazala na mogućnost primjene ovih vrsta u prehrambenoj industriji, a sposobnost inhibicije kolinesteraza na potencijal u prevenciji i liječenju Alzheimerove i drugih neurodegenerativnih bolesti.

Ispitan je neuroprotektivni potencijal fenolnih frakcija listova vrsta *J. oxycedrus* subsp. *badia* i *J. phoenicea* koje rastu u Portugalu. Dobivene frakcije su pokazale sposobnost inhibicije aktivnosti AChE i smanjenje razine reaktivnih kisikovih spojeva u neuronima. Vrsta *J. oxycedrus* subsp. *badia* je djelovala protektivno na neurone u staničnom modelu neurodegeneracije. Primjenom HPLC-MS metode provedena je kvalitativna analiza fenola u istraživanim *Juniperus* ekstraktima te je utvrđena prisutnost katehina, procijanidina, flavonola, flavona i biflavona (Tavares i sur., 2012).

Laouar i sur. (2017) su istražili hepatoprotektivna svojstva smrekinja vrste *J. phoenicea* korištenjem tetraklorougljikom (CCl₄) izazvanog oštećenja jetre u štakora. Vodeni ekstrakt je primijenjen u dozi od 250 mg/kg/dan tijekom 12 dana. Rezultati praćenih biokemijskih parametara u plazmi (aktivnost aspartat aminotransferaze (AST), alanin aminotransferaze (ALT), laktat dehidrogenaze i alkalne fosfataze (ALP), te razina ukupnog bilirubina, albumina i ukupnih proteina) i tkivu jetre (razina lipidne peroksidacije, reduciranog glutationa, aktivnosti glutathion peroksidaze) kao i histopatoloških ispitivanja pokazala su da tretiranje ekstraktom značajno smanjuje hepatotoksičnost u štakora. Dobiveni rezultati su pokazali da vrsta *J. phoenicea* djeluje hepatoprotektivno i da se taj učinak najvjerojatnije može povezati s njenim antioksidacijskim svojstvima.

Alqasoumi i sur. (2013) su ispitali hepatoprotektivno djelovanje frakcija različite polarnosti dobivenih iz nadzemnih dijelova vrste *J. phoenicea* koja raste u Saudijskoj Arabiji.

Hepatoprotektivni učinak je procijenjen određivanjem biokemijskih parametara (aktivnost AST, ALT i ALP, te razina ukupnog bilirubina) kao i pomoću histopatoloških ispitivanja. Primjenom različitih kromatografskih tehnika izolirano je 5 diterpenskih kiselina te 4 flavonoidna derivata. Među njima najbolju sposobnost smanjenja povećanih jetrenih enzima i vraćanja normalnog izgleda hepatocita je pokazao biflavonoid hinokiflavon. Dobiveni učinak bio je usporediv s referentim lijekom silimarinom.

Hepatoprotektivno djelovanje vodenog dekokta češera vrste *J. phoenicea* ispitivano je na štakorima čija je jetra oštećena tioacetamidom. Životinje su tijekom 6 tjedana dobivale ekstrakt vrste *J. phoenicea* oralno u dozi od 250 mg/kg/dan. Procijenjen je učinak na aktivnost jetrenih enzima, razinu malonaldehida, ukupnog bilirubina, albumina i dva citokina (TNF- α i TGF- β 1) u krvi. Također je ispitan učinak na biokemijske parametre u tkivu jetre koji ukazuju na razinu lipidne peroksidacije i fibroze jetre. Primjena ekstrakta je dovela do poboljšanja svih praćenih biokemijskih parametara, ukazujući na dobar hepatoprotektivni učinak vrste *J. phoenicea* koji je bio usporediv s djelovanjem silimarina. Fitokemijska istraživanja su rezultirala izolacijom 4 spoja skutelarina, izoskutelarina, šikiminske kiseline i derivata palmitinske kiseline (Aboul-Ela i sur., 2005).

Keskes i sur. (2017) su ispitali sposobnost hvatanja DPPH radikala i inhibicije α -amilaze metanolnog ekstrakta i 3 frakcije listova vrste *J. phoenicea*. Najbolji učinak pokazala je frakcija iz koje je izoliran biflavonoid amentoflavon čija aktivnost se nije značajno razlikovala od akarboze i BHT-a kao referentnih spojeva.

Procijenjen je antidijabetički učinak *in vitro* vrsta *J. oxycedrus* ssp. *oxycedrus* i *J. communis* var. *saxatilis* na temelju inhibicije α -glukozidaze i α -amilaze. Dodatno je spektrofotometrijski određena sposobnost hvatanja ABTS radikala i sadržaj ukupnih fenola. Istražena je aktivnost vodenih i vodeno-etanolnih ekstrakata listova i češera odabranih vrsta roda *Juniperus*. Vodeno-etanolni ekstrakt češera vrste *J. communis* var. *saxatilis* je najjače inhibirao aktivnost α -glukozidaze (IC₅₀ = 4,4 μ g/mL), dok je vodeno-etanolni ekstrakt listova vrste *J. oxycedrus* ssp. *oxycedrus* pokazao najveći potencijal za inhibiciju α -amilaze (Orhan i sur., 2014).

Orhana i sur. (2011) su ispitali antidijabetičko djelovanje ekstrakata listova i češera vrste *J. oxycedrus* ssp. *oxycedrus* u *in vivo* uvjetima na modelu dijabetesa induciranog streptozotocinom u štakora. Ekstrakti su primjenjeni u dozama od 500 mg/kg i 1000 mg/kg te su razine glukoze u krvi izmjerene prvi, četvrti, sedmi i deseti dan eksperimenta. Sadržaj Fe, Cu i Zn određene su atomskom apsorpcijskom spektrofotometrijom, a razina lipidne

peroksidacije u tkivu jetre i bubrega procijenjena je ultraljubičastom spektrofotometrijom. Utvrđeno je da primjena istraživanih ekstrakata ima povoljan učinak na dijabetes kod štakora što je vidljivo na temelju smanjene razine glukoze u krvi i lipidne peroksidacije u jetri i bubregu, te povećane koncentracije Zn u jetri.

Sahin Yaglioglu i Eser (2017) su ispitali antitumorski učinak metanolnih ekstrakata listova i češera vrsta *J. oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus* i *J. communis* L. u sklopu istraživanja četiri vrste roda *Juniperus* iz turske flore. Antiproliferacijska aktivnost je ispitana na stanicama humanog karcinoma cerviksa (HeLa) i karcinoma mozga štakora (C6) u koncentracijskom nizu od 5 µg/mL do 100 µg/mL. Općenito, ekstrakti listova su pokazali bolju aktivnost od ekstrakata češera na obje stanične linije s IC₅₀ vrijednostima u rasponu 28-43 µg/mL. Dodatno je primjenom HPLC-TOF/MS analize utvrđeno da su rutin i katehin bili glavne fenolne sastavnice istraživanih ekstrakata.

Orhan i sur. (2012) su ispitali protuupalni i antinociceptivni učinak različitih ekstrakata smrekinja i listova vrste *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus* sakupljene u Turskoj. Ekstrakti različite polarnosti su testirani u dozi od 100 mg/kg na eksperimentalnim modelima u miševa: karagenanom uzrokovan edem šape i test grčenja izazvan p-benzokinonom. Najveću djelotvornost u oba testa pokazao je butanolni ekstrakt bez uzrokovanja oštećenja želuca ili vidljive akutne toksičnosti.

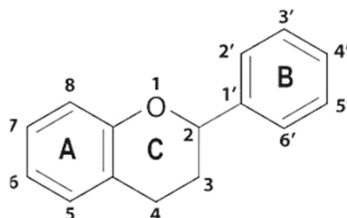
Karaman i sur. (2003) su istražili *in vitro* antimikrobna svojstva vodenog i metanolnog ekstrakta listova vrste *J. oxycedrus* sakupljene u Turskoj. Učinak je ispitan na 56 sojeva bakterija i 5 sojeva gljivica primjenom metode disk-difuzije i dilucije kojom su određene minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) i minimalne baktericidne koncentracije (MBK). Vodeni ekstrakt nije pokazao djelovanje na ispitivane mikroorganizame, dok je metanolni ekstrakt djelovao na rast 24 bakterijska soja unutar rodova *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Brevundimonas*, *Brucella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* i *Xanthomonas*. Alkohoni ekstrakt je također pokazao antifungalni učinak na vrstu *Candida albicans*.

U svrhu procjene mogućnosti zaštite žitarica tijekom skladištenja Dane i sur. (2016) su ispitali insekticidni i antifungalni učinak metanolnog ekstrakta vrste *J. phoenicea* sakupljene u Alžiru. Ekstrakt je djelovao toksično na vrstu *Sitophilus oryzae* te je uzrokovao smanjenje rasta dviju gljivica iz roda *Fusarium*. UPLC-PDA-MS analiza je pokazala da su kvercetin-3-O-ramnozid i katehin bile glavne polifenolne sastavnice.

1.3. Polifenoli kao bioaktivne sastavnice roda *Juniperus*

Polifenolni spojevi široko su rasprostranjeni u biljnim vrstama. Netopljivi fenoli doprinose mehaničkoj čvrstoći staničnog zida i imaju regulatornu ulogu u rastu biljke i morfogenezi, dok fenoli, prisutni unutar stanice, imaju ulogu u odgovoru na stres i patogene. Danas postoji nekoliko tisuća polifenola od biološkog interesa, spojeva koji imaju više od jedne fenolne hidroksilne skupine vezane na jedan ili više benzenskih prstena. Polifenoli su najbrojniji biljni sekundarni metaboliti. Najviše biljnih polifenola je izvedeno iz *trans* cimetne kiseline, koja za prekursor ima aminokiselinu *L*-fenilalanin. Zajednička značajka svih biljnih polifenola je prisutnost hidroksi-supstituiranog benzenskog prstena u njihovoj strukturi. Ovisno o broju prisutnih fenolnih prstenova i strukturnim elementima koji povezuju te prstenove međusobno, možemo ih podijeliti u nekoliko skupina: flavonoidi, fenolne kiseline, stilbeni i lignani (Vladimir-Knežević i sur., 2012).

Flavonoidi predstavljaju najveću skupinu biljnih polifenola s više od 6000 identificiranih struktura. Osnovnu strukturu flavonoida čine dvije benzenske jezgre (A i B) povezane s propanskim lancem (C₆-C₃-C₆) koji uglavnom s atomom kisika čini piranski prsten (C) (Slika 4).



Slika 4. Osnovna struktura flavonoida

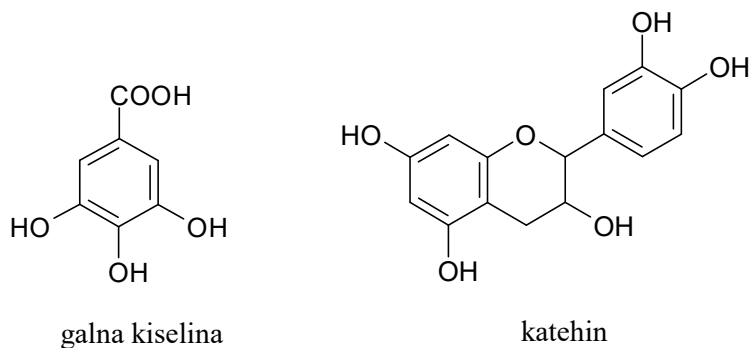
Biosintetiziraju se kombinacijom puta šikiminske kiseline i acilpolimalonatnog puta. Ovisno o tipu heterocikla koji je uključen u strukturi flavonoida, možemo ih podijeliti u 6 podskupina: flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanoli, antocijanidini i izoflavonoidi. Navedena podjela se primarno temelji na prisutnosti (ili odsutnosti) dvostruke veze na položaju 4 središnjeg (C) prstena, zatim dvostrukoj vezi između C2 i C3 središnjeg (C) prstena te hidroksilnim skupinama na B prstenu. Flavone karakterizira prisutnost dvostruke veze između C2 i C3 atoma heterocikličkog prstena. Benzenski prsten (B) vezan je na C2 atom dok C3 uglavnom nije supstituiran. Flavonoli na položaju C3 središnjeg prstena imaju hidroksilnu skupinu, dok flavononi imaju zasićeni heterociklički prsten. Oba navedena svojstva su prisutna u strukturi

flavanola. Antocijanidini su pozitivno nabijeni u kiselom pH i taj ravnotežni oblik se naziva flavilium kation. Za razliku od flavonoida kod kojih je benzenski prsten (B) vezan s piranskim prstenom preko C2 atoma, kod izoflavonoida je smješten na C3 atomu.

Flavonoidi se u prirodi rjeđe pojavljuju u slobodnom obliku, uglavnom su glikozidno vezani i dolaze kao O-glikozidi, a ponekad kao i C-glikozidi. Kod O-glikozida šećerna je komponenta vezana na hidroksilnu skupinu aglikona na poziciji C3 ili C7, dok je kod C-glikozida vezana na ugljik aglikona, uglavnom na poziciji C6 ili C8. Šećernu komponentu najčešće čine glukoza, ramnoza, galaktoza i arabinoza u obliku monosaharida ili rutinoza i neohesperidoza u obliku disaharida (Vladimir-Knežević i sur., 2012).

U skladu s raznolikom kemijskom strukturom flavonoida, dokazani su i brojni biološki učinci na kojima se temelji uporaba droga s flavonoidima. Pojednim flavonoidima znanstveno je dokazano antioksidacijsko, protuupalno, antimikrobno, antivirusno, protutumorsko, antidijabetično, kardioprotektivno, antitrombozno, estrogeno te spazmolitičko djelovanje (Chen i sur., 2015; Kumar i Pandey, 2013; Romano i sur., 2013).

Trjeslovine su izrazito heterogena skupina polifenolnih spojeva prisutna u gotovo svim biljnim vrstama. One čine dvije osnovne skupine, trjeslovine koje hidroliziraju (galotanini, elagnatanini) i kondenzirane (katehinske) trjeslovine. Prva skupina trjeslovina obuhvaća tanine i depside. Tanini su esteri galne kiseline (Slika 5) ili esterskih anhidrida više galnih kiselina sa šećerom, dok depsidi predstavljaju esterski vezane fenolne kiseline. Proantocijanidini ili kondenzirane trjeslovine su flavanski polimeri u kojima su jedinice flavan-3-ola povezane C-C vezom, najčešće 4→8 ili 4→6. Glavni strukturni elementi proantocijanidina su primjerice katehin (Slika 5), epikatehin, galokatehin, epigalokatehin te fisetidin.



Slika 5. Osnovni strukturni elementi galotanina i katehinskih trjeslovina

Droge s trjeslovinama se najčešće primjenjuju kao adstrigensi i antidijaroici (Bruneton, 1999). Također je znanstveno dokazano da su trjeslovine biološki vrlo aktivni spojevi koji posjeduju antivirusnu, antibakterijsku, antioksidacijsku, antidijabetsku i protutumorsku aktivnost (Serrano i sur., 2009; Zhang i sur., 2009).

1.4. Oksidacijski stres i antioksidansi

U novije vrijeme, s obzirom da stresan i užurban način života uvelike utječe na naše zdravlje, veliki interes znanstvenika usmjeren je na istraživanje ljekovitih biljnih vrsta kao izvora novih antioksidansa. Smatra se da njihova primjena ima potencijal u prevenciji i liječenju oboljenja povezanih s oksidacijskim stresom. Oksidacijski stres se definira kao neravnoteža između stvaranja i eliminacije slobodnih radikala i drugih reaktivnih kisikovih i dušikovih spojeva koji nastaju redoks reakcijama tijekom normalnog staničnog metabolizma ili kao rezultat negativnih utjecaja vanjskih čimbenika. Znanstveno je dokazano da upravo ta neravnoteža vodi do oksidacije biološki važnih makromolekula (proteini, lipidi, ugljikohidrati i DNA), a posljedično i do oštećenja i smrti stanica. Oksidacijski stres ima ključnu ulogu u nastanku i razvoju brojnih bolesti kao što su kardiovaskularne, neurodegenerativne i upalne bolesti, karcinom i dijabetes te i samog procesa starenja.

Tijekom evolucije organizam je razvio sustav antioksidacijske obrane, koji može biti enzimski (superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza) i neenzimski (vitamin C i E, glutation). S obzirom da endogeni zaštitni sustav ne može uvijek obraniti organizam od oksidacijskog stresa kojem je izložen, u novije vrijeme veliku popularnost stječu egzogeni antioksidansi prirodnog porijekla. Velik broj znanstvenih radova objavljenih u posljednjih nekoliko godina ističu polifenole kao prirodne spojeve snažnih antioksidacijskih svojstava. Glavni mehanizmi putem kojih polifenoli ostvaruju svoj antioksidacijski učinak i na taj način sprječavaju oštećenja biološki značajnih molekula su sposobnost uklanjanja slobodnih radikala, sprječavanje njihovog nastajanja putem keliranja metalnih iona, redukcijska sposobnost, inhibicija lipidne peroksidacije, regulacija obrambenih enzima i djelovanja na stanične signalne puteve i ekspresiju gena (Kindl i sur., 2015).

2. OBRAZLOŽENJE TEME



U posljednje vrijeme prisutan je sve veći znanstveni interes za istraživanjem polifenola zbog njihove potencijalne primjene u prevenciji i terapiji niza bolesti. Iz tog su razloga istraživanja biljnih vrsta kao novih izvora polifenolnih spojeva vrlo raznolike i jedinstvene kemijske strukture, danas vrlo aktualna. Hrvatska flora obiluje brojnim biljnim vrstama s velikim ljekovitim potencijalom, od kojih su mnoge znanstveno vrlo slabo ispitane. U okviru ovog diplomskog rada istražene su tri vrste roda *Juniperus* koje rastu u Hrvatskoj: *J. communis* L., *J. oxycedrus* L. i *J. phoenicea* L.. Smrekinje vrste *J. communis* koriste se u suvremenoj fitoterapiji kao službeno priznata farmakopejska droga (Juniperi galbulus) za poticanje diureze te kod probavnih tegoba, dok se druge vrste tog roda koriste u pučkoj medicini brojnih naroda. Stoga je cilj ovog diplomskog rada bio istražiti fitokemijski sastav i antioksidacijsko djelovanje polifenola u listovima i grančicama odabranih vrsta roda *Juniperus* hrvatske flore da bi se procijenio biomedicinski potencijal ostalih biljnih organa farmakopejske biljne vrste (*J. communis*) te kako bi se doprinjelo znanstvenim spoznajama o biološki aktivnim tvarima vrsta *J. oxycedrus* i *J. phoenicea*.

Provedena su istraživanja sa sljedećim ciljevima:

- provesti usporedno fitokemijsko istraživanje polifenolnih sastavnica u listovima i grančicama odabranih vrsta roda *Juniperus*
 - primjenom tankoslojne kromatografije visoke djelotvornosti (HPTLC) provesti kvalitativnu analizu polifenola,
 - različitim spektrofotometrijskim metodama odrediti sadržaj polifenolnih bioaktivnih sastavnica,
- ispitati antioksidacijsko djelovanje etanolnih ekstrakata listova i grančica odabranih vrsta roda *Juniperus* primjenom različitih spektrofotometrijskih metoda:
 - odrediti sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala,
 - ispitati moć redukcije iona željeza(III),
 - istražiti sposobnost keliranja iona željeza(II).

3. MATERIJALI I METODE



3.1. Materijali

3.1.1. Istraživani biljni materijal

U eksperimentalnom dijelu ovog diplomskog rada korišteni su listovi i grančice triju vrsta roda *Juniperus* L. (Cupressaceae) sakupljeni u studenom i prosincu 2017. godine na dvije lokacije u Republici Hrvatskoj (Tablica 1). Identifikacija biljnog materijala provedena je na Zavodu za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta prema dostupnim literaturnim podacima (Domac, 2002; Tutin i sur., 1972). Prikupljeni biljni materijal osušen je na zraku pri sobnoj temperaturi, uz zaštitu od svjetlosti.

Tablica 1. Istraživani biljni materijal i lokacije sakupljanja

Biljna vrsta	Lokacija sakupljanja
<i>Juniperus communis</i> L.	Karlovac
<i>Juniperus oxycedrus</i> L.	Dugi otok
<i>Juniperus phoenicea</i> L.	Dugi otok

3.1.2. Instrumenti i pribor

U eksperimentalnom dijelu rada korišteni su sljedeći instrumenti:

- analitička vaga (Mettler-Toledo, Švicarska-SAD)
- laboratorijska tresilica (GFL, Hannover, Njemačka)
- ploče za tankoslojnu kromatografiju visoke djelotvornosti HPTLC silikagel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- rotacijski vakuum uparivač Büchi (Büchi Labortechnik AG, Postfach, Švicarska)
- termostat (Inko, Zagreb, Hrvatska)
- ultrazvučna kupelj Sonorex Digital 10 P (Bandelin, Berlin, Njemačka)
- UV lampa (Camag, Muttenz, Švicarska)
- UV-Vis spektrofotometar *Helios γ* (Spectronic Unicam, Cambridge, Velika Britanija)
- vodena kupelj (Inko, Zagreb, Hrvatska)

3.1.3. Reagensi, standardi i ostale kemikalije

U eksperimentalnom dijelu rada korišteni su sljedeći reagensi, standardi i ostale kemikalije:

- aceton (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- aluminijev klorid heksahidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 2-aminoetil-difenilborat (Fluka, Buchs, Švicarska)
- butanol (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- etanol 96 % p.a. (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- etilacetat (POCH S. A., Gliwice, Poljska)
- etilendiamin tetraoctena kiselina (EDTA) (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- etilformijat ≥ 97 % (Fluka, Buchs, Švicarska)
- ferozin (dinatrijeva sol 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazin-4',4''-disulfonske kiseline) (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- Folin-Ciocalteu reagens (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- heksametilentetramin (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- kalijev heksacijanoferat (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- kloridna kiselina 37 % (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- kožni prašak (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- metanol (T.T.T., Zagreb, Hrvatska)
- mravlja kiselina 98-100 % (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev dihidrogenfosfat dihidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev hidrogenfosfat dihidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev karbonat dekahidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev sulfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- octena kiselina $\geq 99,5$ % (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- pirogolol 99 % (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- polietilenglikol 4000 (Fluka, Buchs, Švicarska)
- trikloroctena kiselina (Acros Organics, Geel, Belgija)
- troloks ≥ 98 % (Fluka, Buchs, Švicarska)
- željezov(III) klorid heksahidrat (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- željezov(II) klorid (Fluka, Buchs, Švicarska)

3.2. Istraživanje polifenolnih sastavnica metodom tankoslojne kromatografije visoke djelotvornosti (HPTLC)

3.2.1. Priprema uzoraka i standarda

Na zraku osušen biljni materijal samljeven je u prah. Uzeto je po 1 g praškastog uzorka i ekstrahirano 10 minuta s 10 mL metanola na vodenoj kupelji pri 60 °C, uz povratno hladilo. Dobiveni filtrati korišteni su kao ispitivane otopine za kromatografska ispitivanja prisutnosti flavonoida i trjeslovina. Otopine standardnih flavonoidnih glikozida (rutin, izokvercitrin i kvercitrin), flavonoidnih aglikona (luteolin, apigenin i kvercetin) i trjeslovina (galna kiselina) pripremljene su otapanjem u metanolu u koncentraciji od 0,05 % (Wagner i Bladt, 2009).

3.2.2. Ispitivanje flavonoida

HPTLC analiza flavonoida provedena je na pločama s tankim slojem silikagela 60 F₂₅₄, na koje su pomoću kapilare linijski (10 mm duljine) nanieseni uzorci i otopine standarda (10 µL). Kao pokretna faza za odjeljivanje flavonoidnih glikozida korištena je smjesa etilacetata, mravlje kiseline i vode u volumnim omjerima 8:1:1 (*V/V/V*) (Blažeković i sur., 2006). Također, ispitana je prisutnost flavonoidnih aglikona primjenom smjese otapala toluen-etilformijat-mravlja kiselina 5:4:1 (*V/V/V*). Odjeljene sastavnice detektirane su nakon prskanja kromatograma modificiranim Naturstoff-reagensom (1 %-tna metanolna otopina 2-aminoetil-difenilborata i 5 %-tna etanolna otopina polietilenglikola 4000, NST/PEG), promatranjem ploče pod UV svjetlom na 365 nm (Wagner i Bladt, 2009).

3.2.3. Ispitivanje trjeslovina

Odjeljivanje trjeslovina prisutnih u istraživanim biljnim uzorcima provedeno je na pločama s tankim slojem silikagela 60 F₂₅₄, na koje su pomoću kapilare linijski (10 mm duljine) nanieseni uzorci i otopine standarda (10 µL). Mobilna faza, korištena za odjeljivanje trjeslovina, bila je smjesa etilformijata, mravlje kiseline i vode u volumnim omjerima 8:1:1. Detekcija odjeljenih sastavnica provedena je prskanjem ploče 5 %-tnom otopinom željezovog(III) klorida i promatranjem dobivenog kromatograma na vidljivom svjetlu (Wojciak-Kosior i Oniszczyk, 2008).

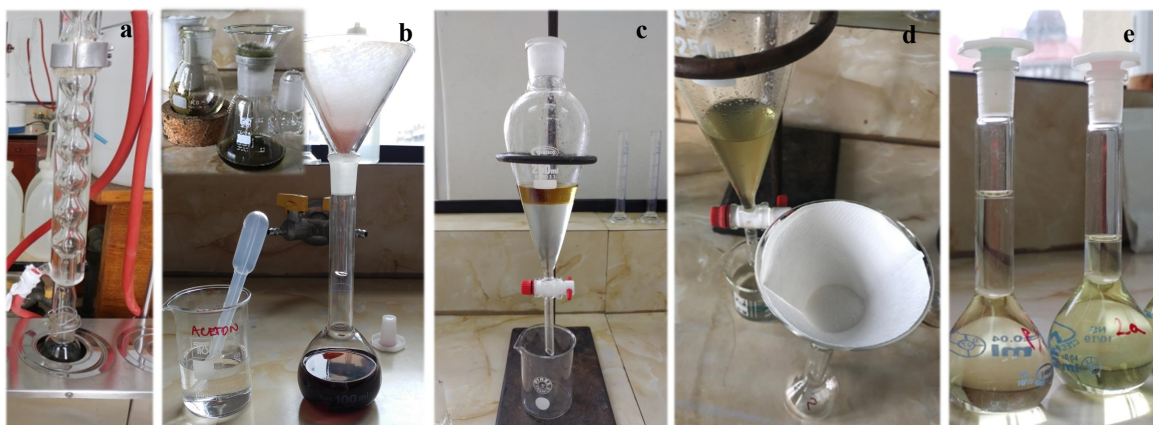
3.3. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja polifenola

3.3.1. Određivanje flavonoida

Određivanje sadržaja flavonoida u istraživanim biljnim uzorcima provedeno je spektrofotometrijskom metodom prema farmakopejskom postupku (EDQM, 2018). Nakon što je suhi biljni materijal usitnjen u prah, u tikvicu okruglog dna od 100 mL stavljeno je 1,000 g droge u prašku, 1 mL 5 g/L otopine heksametilentetramina, 20 mL acetona i 2 mL kloridne kiseline (250 g/L), te je sadržaj zagrijavan 30 minuta na vodenoj kupelji, uz povratno hladilo (Slika 6a). Hidrolizat je filtriran preko malo pamuka, a ostaci droge u tikvici i na pamuku ponovno su ekstrahirani dva puta s 20 mL acetona, zagrijavanjem tijekom 10 minuta. Nakon hlađenja, sjedinjeni filtrati filtrirani su preko filter-papira uz ispiranje tikvice i filter-papira, te je otopina razrijeđena acetonom do 100,0 mL (Slika 6b). U lijevak za odjeljivanje preneseno je 20,0 mL acetonskog ekstrakta i pomiješano s 20 mL vode. Sadržaj u lijevku prvo je izmućkivan s 15 mL etilacetata, a zatim još tri puta s po 10 mL etilacetata (Slika 6c). Sjedinjeni etilacetatni slojevi isprani su dva puta s 50 mL vode te filtrirani preko 10 g bezvodnog natrijevog sulfata u odmjernu tikvicu od 50,0 mL te je sadržaj nadopunjen etilacetatom do oznake (Slika 6d). 10,0 mL dobivenog etilacetatnog ekstrakta pomiješano je s 1,0 mL reagensa aluminijevog klorida (2,0 g aluminijeva klorida heksahidrata otopljeno u 100 mL 5 %-tne metanolne otopine octene kiseline) u odmjernoj tikvici od 25,0 mL i razrijeđeno s 5 %-tnom metanolnom otopinom octene kiseline do oznake. Za pripremu poredbene otopine 10,0 mL etilacetatnog ekstrakta je razrijeđeno do 25,0 mL s 5 %-tnom metanolnom otopinom octene kiseline (Slika 6e). Apsorbancija ispitivane otopine izmjerena je nakon 30 minuta na 425 nm u odnosu na poredbenu otopinu. Maseni udio flavonoida, izražen kao hiperozid, izračunat je prema izrazu:

$$\% \text{flavonoida} = \frac{A \times 1,25}{m}$$

gdje A predstavlja apsorbanciju ispitivane otopine na 425 nm, a m masu droge u gramima.



Slika 6. Određivanje flavonoida (a) ekstrakcija na vodenoj kupelji uz povratno hladilo (b) priprema acetonskog ekstrakta (c) izmućkavanje s etilacetatom (d) filtriranje preko bezvodnog natrijevog sulfata (e) poredbena i ispitivana otopina

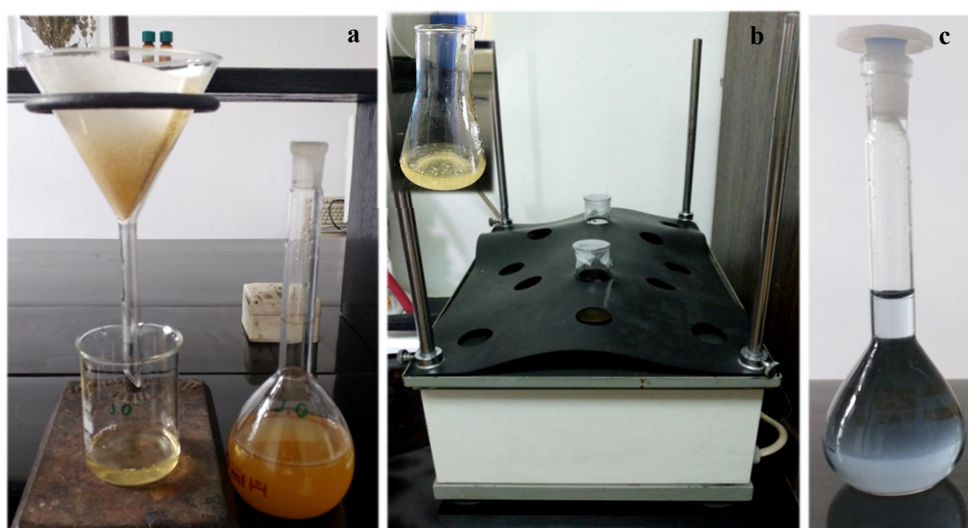
3.3.2. Određivanje ukupnih polifenola i trjeslovina

Sadržaj ukupnih polifenola i trjeslovina u listovima i grančicama ispitivanih vrsta roda *Juniperus* određen je spektrofotometrijskom metodom prema farmakopejskom postupku opisanom u literaturi (EDQM, 2018). 1,000 g praškasto usitnjenog biljnog materijala pomiješano je u tikvici okruglog dna od 250 mL sa 150 mL vode, nakon čega je provedena ekstrakcija zagrijavanjem 30 minuta na vodenoj kupelji uz povratno hladilo. Dobiveni ekstrakt ohlađen je pod tekućom vodom, kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu, razrijeđen destiliranom vodom do 250,0 mL te profiltriran. Prvih 50 mL filtrata se baci dok ostatak filtrata se uzima za analizu (Slika 7a). 5,0 mL filtrata se prenese u odmjernu tikvicu od 25,0 ml te se nadopuni vodom do oznake. Potom se 2,0 mL te otopine pomiješa s 1,0 mL Folin-Ciocalteu reagensa i 10,0 mL vode u odmjernoj tikvici od 25 mL te je sadržaj nadopunjen otopinom natrijevog karbonata (290 g/L) do oznake. Apsorbacija se mjeri nakon 30 minuta na 760 nm (A_1), uz vodu kao poredbenu otopinu. Za određivanje polifenola neadsorbiranih na kožni prašak (netaninskih polifenola), u 10,0 mL filtrata dodano je 0,1000 g kožnog praška i sadržaj tikvice snažno je mućkan tijekom 60 minuta (Slika 7b). Nakon filtriranja, 5,0 mL dobivenog filtrata razrijedi se vodom do 25,0 mL, potom se 2,0 mL te otopine pomiješa u odmjernoj tikvici od 25 mL s 1,0 mL Folin-Ciocalteu reagensa i 10,0 mL vode, a sadržaj tikvice se zatim nadopuni do oznake otopinom natrijevog karbonata (290 g/L). Apsorbancija je izmjerena nakon 30 min na 760 nm (A_2), uz vodu kao poredbenu otopinu (Slika 7c). Standardna otopina pirogalola pripremljena je otapanjem 50,0 mg pirogalola u

destiliranoj vodi u odmjernoj tikvici od 100,0 mL, te je zatim 5,0 mL dobivene otopine razrijeđeno vodom do 100,0 mL. U odmjernoj tikvici od 25,0 mL, alikvot od 2 mL dobivene otopine pomiješan je s 1,0 mL Folin-Ciocalteu reagensa i 10,0 mL vode te sadržaj tikvice nadopunjen je do oznake otopinom natrijevog karbonata (290 g/L). Nakon 30 minuta, izmjerena je apsorbancija na 760 nm (A_3), uz vodu kao poredbenu otopinu. Postotni udio trjeslovina, izražen kao pirogalol, izračunat je prema izrazu:

$$\% \text{ trjeslovina} = 62,5 \times \frac{(A_1 - A_2) \times m_2}{A_3 \times m_1}$$

gdje je m_1 masa ispitivanog uzorka u gramima, a m_2 masa pirogalola u gramima.



Slika 7. Određivanje ukupnih polifenola i trjeslovina (a) priprema vodenog ekstrakta (b) mućkanje filtrata s kožnim praškom na laboratorijskoj tresilici (c) ispitivana otopina

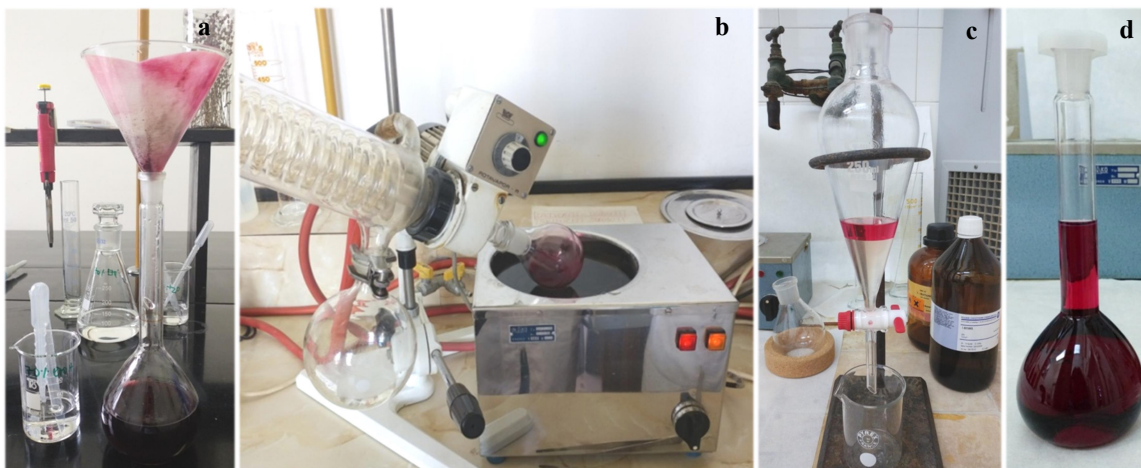
3.3.3. Određivanje procijanidina

Kvantitativna analiza procijanidina u istraživanim vrstama roda *Juniperus* provedena je spektrofotometrijskom metodom prema farmakopejskom postupku opisanom u literaturi uz male modifikacije (EDQM, 2018). U tikvici okruglog dna pomiješano je 2,50 g praškasto usitnjenog biljnog materijala i 30 mL 70 %-tnog etanola te je ekstrakcija provedena zagrijavanjem 30 minuta na vodenoj kupelji uz povratno hladilo. Nakon filtriranja, filter-papir ispran je s 10,0 mL 70 %-tnog etanola. Filtratu je dodano 15,0 mL kloridne kiseline (250 g/L) i 10,0 mL vode, a zatim sadržaj tikvice zagrijavan je 80 minuta na vodenoj kupelji, pod povratnim hladilom. Nakon što je ohlađena smjesa profiltrirana, ostatak na filter-papiru ispran

je s 70 %-tnim etanolom sve dok filtrat nije postao bezbojan, a potom je filtrat razrijeđen 70 %-tnim etanolom do 250,0 mL (Slika 8a). Alikvot dobivene otopine od 25,0 mL prenesen je u tikvicu s okruglim dnom te je reduciran na volumen od oko 3 mL uparavanjem na rotavaporu (Slika 8b), potom je prenesen u ljevak za odjeljivanje, uz ispiranje tikvice s 10 mL i 5 mL vode. Sjedinjene otopine izmučkivane su tri puta s po 15 mL butanola (Slika 8c), a dobiveni organski ekstrakti su sjedinjeni i razrijeđeni butanolom do 100,0 mL (Slika 8d). Apsorbancija dobivene otopine izmjerena je na 555 nm, uz butanol kao poredbenu otopinu. Udio procijanidina izračunat je kao cijanidin klorid prema izrazu:

$$\% \text{ procijanidina} = \frac{A \times 1000}{1200 \times m}$$

gdje *A* predstavlja apsorbanciju ispitivane otopine na 555 nm, a *m* masu droge u gramima.

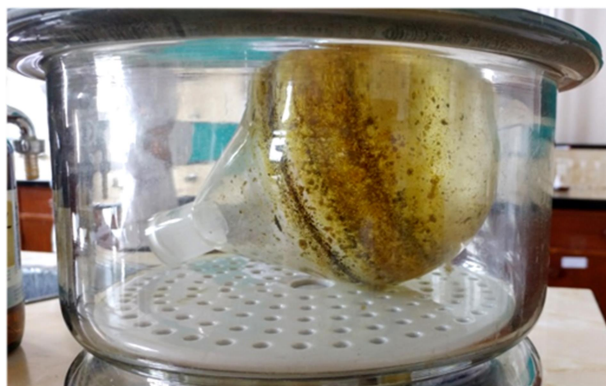


Slika 8. Određivanje procijanidina (a) priprema etanolnog ekstrakta (b) uparavanje pomoću rotacijskog vakuum-uparivača (c) izmučkavanje s butanolom (d) ispitivana otopina

3.4. Istraživanje antioksidacijskog djelovanja

3.4.1. Priprema uzoraka i standarda

U svrhu istraživanja antioksidacijskog djelovanja 10,00 g praškasto usitnjenog biljnog materijala preliveno je sa 100 mL 70 %-tnog etanola i ekstrahirano u ultrazvučnoj kupelji na 30 °C tijekom 30 minuta. Nakon filtriranja, biljnom materijalu je dodana nova porcija od 100 mL istog otapala te je ekstrakcija ponovljena. Dobiveni filtrati su sjedinjeni i upareni do suha pomoću rotacijskog vakuum-uparivača. Tikvica s ekstraktom ostavljena je još jedan dan u eksikatoru (Slika 9), potom izvagana te suhi ekstrakt čuvan u hladnjaku na 4 °C. Iskorištenja dobivenih ekstrakata bila su prema navedenom nizu: *J. communis* (23,5 %), *J. oxycedrus* (21,2 %) i *J. phoenicea* (24,2 %).



Slika 9. Sušenje ekstrakta uparenog pomoću rotacijskog vakuum-uparivača u eksikatoru

Neposredno prije ispitivanja pripremljene su osnovne otopine *Juniperus* ekstrakata iz kojih su dvostrukim serijskim razrjeđivanjem dobiveni nizovi testiranih koncentracija. Na isti način su pripremljene otopine standarda, troloksa i etilendiamin tetraoctene kiseline (EDTA).

3.4.2. Određivanje sposobnosti hvatanja DPPH slobodnog radikala

Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala (antiradikalna aktivnost) istražena je spektrofotometrijskom metodom opisanom u radu Kindl i sur. (2015). U tu svrhu suhi ekstrakti i troloks, kao referentni antioksidansi, otopljeni su u etanolu te su serijskim razrjeđivanjem pripremljeni nizovi testiranih koncentracija u rasponu 0,2-100 µg/mL. U epruvete s 1,5 mL etanolnih otopina uzoraka različitih koncentracija dodano po 0,5 mL svježe pripremljene 0,1 mM etanolne otopine DPPH radikala i sadržaj je snažno promućkan.

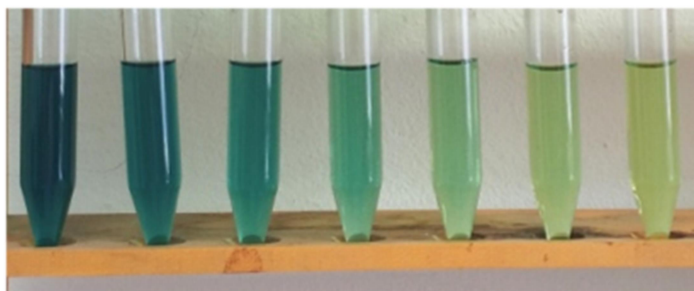
Reakcijska smjesa je inkubirana pri sobnoj temperaturi na tamnom mjestu tijekom 30 min, a potom je izmjerena apsorbancija ispitivanih otopina na valnoj duljini od 517 nm, uz 96 % etanol kao slijepu probu. Niža vrijednost apsorbancije upućivala je na veće antioksidacijsko djelovanje. Sposobnost hvatanja DPPH radikala, izražena u postocima, izračunata je prema sljedećem izrazu:

$$\% \text{ DPPH antiradikalne sposobnosti} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

gdje A_0 predstavlja apsorbanciju kontrolne otopine koja je umjesto testiranog uzorka sadržavala jednaku količinu otapala (etanol), dok A_1 predstavlja apsorbanciju ispitivane otopine umanjenu za apsorbanciju samog uzorka.

3.4.3. Određivanje sposobnosti redukcije iona željeza(III)

Sposobnost redukcije iona željeza(III) za ekstrakte biljnih vrsta roda *Juniperus* te referentni antioksidans (troloks) ispitana je primjenom metode opisane u radu Kindl i sur. (2015). Serijskim razrjeđivanjem priređen je koncentracijski niz uzoraka u rasponu od 0,8-100 µg/mL. U 1,0 mL uzorka dodano je 2,5 mL fosfatnog pufera (0,2 M, pH 6,6) i 2,5 mL 1 %-tne otopine kalijeva heksacijanoferata, a potom je smjesa inkubirana 20 minuta na 50 °C. Zatim je u smjesu dodano 2,5 mL 10 %-tne trikloroctene kiseline te je uzeto 2,5 mL te otopine i pomješano s 2,5 mL destilirane vode i 0,5 mL 0,1 %-tne otopine željezovog(III) klorida. Apsorbancija dobivene zelenoplave otopine izmjerena je na 700 nm, uz destiranu vodu kao slijepu probu (Slika 10). Koncentracija ispitivanog uzorka koja je uzrokovala apsorbanciju od 0,500 odgovara 50 %-tnoj redukcijskoj sposobnosti (IC₅₀).



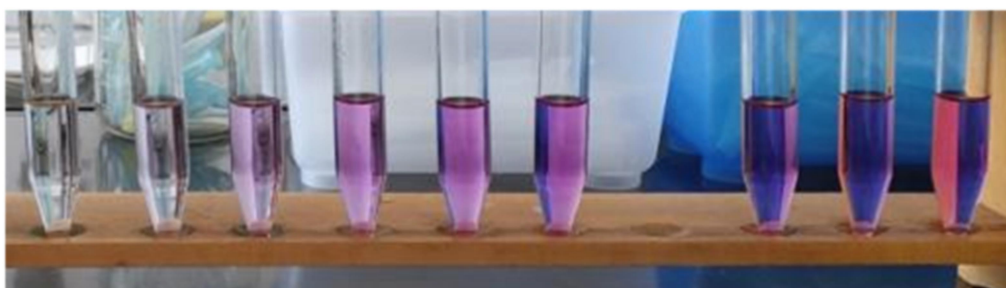
Slika 10. Određivanje redukcijske sposobnosti etanolnog ekstrakta

3.4.4. Određivanje sposobnosti keliranja iona željeza(II)

Sposobnost keliranja iona željeza(II) *Juniperus* ekstrakata i polifenolnih sastavnica, određena je spektrofotometrijskom metodom prema ranije opisanom postupku uz male modifikacije (Kindl i sur., 2015). Serijskim razrjeđivanjem u 70 %-tnom etanolu pripremljen je niz ispitivanih uzoraka u rasponu koncentracija od 12,5-800 µg/mL. U 400 µL ispitivanog uzorka dodano je 50 µL 2 mM otopine željezovog(II) klorida i 3,35 mL 96 % etanola. Potom je dodano 200 µL 5mM otopine ferozina, otopina je snažno promućkana i ostavljena stajati 10 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbancija ružičaste otopine izmjerena je na 562 nm, uz etanol kao slijepu probu. Usporedno je testirana EDTA kao referentni kelator (Slika 11). Postotak inhibicije formiranja ferozin-Fe²⁺ kompleksa, odnosno učinak keliranja metalnih iona, izračunat je prema izrazu:

$$\% \text{ keliranja željeza(II)} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

gdje A_0 predstavlja apsorbanciju kontrolne otopine bez uzorka, a A_1 označava apsorbanciju ispitivane otopine korigiranu za vrijednost absorbancije samog uzorka.



Slika 11. Određivanje kelirajuće aktivnosti EDTA

3.5. Statistička analiza

Za statističku obradu dobivenih rezultata korišten je računalni program Microsoft Exel 2010 programskoga paketa Microsoft Office (Microsoft, SAD) i GraphPad QuickCalcs (GraphPad Software, La Jolla, SAD). Dobiveni podaci prikazani su kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija triju određivanja. Koncentracije uzoraka koje ostvaruju 50 %-tni učinak (IC₅₀) dobivene su interpolacijom na temelju linearne regresijske analize odnosa koncentracije i učinka. Za testiranje statističke razlike između dvije skupine podataka korišten je t-test. Sva zaključivanja u radu provedena su uz razina značajnosti $P < 0,05$

4. REZULTATI I RASPRAVA

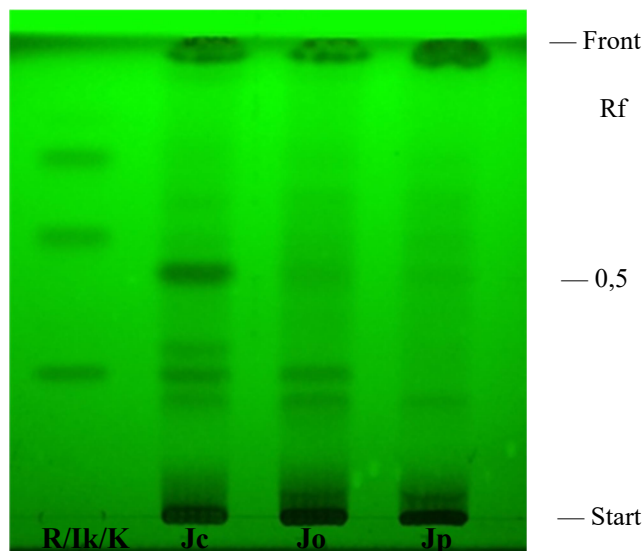


4.1. HPTLC karakterizacija polifenolnih sastavnica

Kvalitativna analiza odabranih vrsta roda *Juniperus* provedena je tankoslojnom kromatografijom visoke djelotvornosti. Ispitana je prisutnost flavonoida (glikozida i aglikona) i trjeslovina, primjenom silikagel ploče kao nepokretne faze i odgovarajućih pokretnih faza te reagensa za detekciju. Bioaktivne sastavnice su karakterizirane prema položaju odijeljenih zona tj. faktoru zaostajanja (R_F) te boji i intenzitetu obojenja tih zona, u usporedbi s odgovarajućim referentnim spojevima (Kaštelan-Macan i sur., 2006).

4.1.1. Flavonoidi

U svrhu ispitivanja prisutnosti flavonoidnih glikozida provedeno je kromatografsko odjeljivanje metanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Juniperus* na tankom sloju silikagela primjenom prikladne smjese otapala etilacetat-mravlja kiselina-voda 8:1:1 ($V/V/V$). Sastavnice su vizualizirane pod UV svjetlom na 254 nm i 365 nm prije i nakon prskanja ploče NST/PEG reagensom, a rezultati su prikazani na Slikama 12 i 13. Nakon prskanja i promatranja kromatograma na 365 nm u svim biljnim vrstama uočeno je nekoliko zona narančaste fluorescencije u R_F području od 0,30 do 0,74 (Slika 13). Na temelju boje fluorescencije odjeljenih flavonoidnih sastavnica mogla se pretpostaviti njihova pripadnost kvercetinским derivatima, što je u skladu s prethodno objavljenim istraživanjima (Vasiljević i sur., 2018; Keskes i sur., 2017; Lesjak i sur., 2014). Kromatografsku sliku metanolnih ekstrakata vrsta *J. communis* i *J. oxycedrus* karakterizirala je prisutnost intenzivne narančaste zone ($R_F = 0,30$) koja je položajem i bojom odgovarala poredbenoj supstanciji rutinu, te je intenzitet fluorescencije detektirane zone bio isti za obje vrste. Nadalje u ovim je vrstama, usporedbom kromatograma istraživanih vrsta i poredbenih supstancija, ustanovljena prisutnost izokvercitrina ($R_F = 0,58$) i kvercitrina ($R_F = 0,75$). Sadržaj tih kvercetinskih glikozida bio je veći u vrsti *J. oxycedrus*, na što su ukazale zone intenzivnije fluorescencije. Slaba zona koja kromatografski odgovara kvercitrinu uočena je i u vrsti *J. phoeniceae*. Na kromatogramu ove vrste bila je vidljiva intezivna žuta zona s R_F vrijednošću 0,49, dok u drugim istraživanim vrstama nije detektirana. U svim je vrstama bila vidljiva nepolarna zona intezivne žute fluorescencije ($R_F = 0,95$) koja je ukazala na prisutnost flavonoidnih aglikona. Dobiveni kromatogrami istraživanih vrsta roda *Juniperus* pokazali su da vrsta *J. oxycedrus* ima sličan sastav flavonoidnih glikozida u odnosu na *J. communis*, dok se vrsta *J. phoenicea* razlikuje.



Slika 12. Zone gašenja fluorescencije na kromatogramu flavonoidnih glikozida u listovima i grančicama vrsta roda *Juniperus*

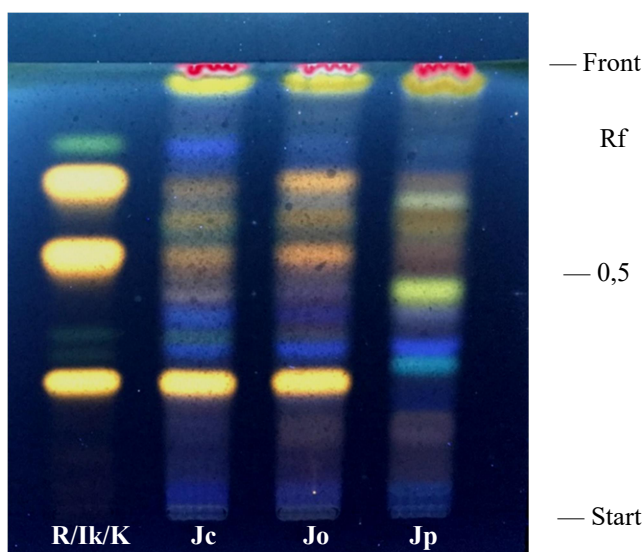
Nepokretna faza: Kieselgel 60 F₂₅₄ TLC ploča

Pokretna faza: etilacetat-mravlja kiselina-voda 8:1:1 (V/V/V)

Detekcija: UV-254 nm

Metanolni biljni ekstrakti: **Jc** - *J. communis*, **Jo** - *J. oxycedrus*, **Jp** - *J. phoenicea*

Poredbene supstancije: **R** - rutin ($R_F = 0,30$), **Ik** - izokvercitrin ($R_F = 0,58$),
K - kvercitrin ($R_F = 0,75$)



Slika 13. Kromatogram flavonoidnih glikozida u u listovima i grančicama vrsta roda *Juniperus*

Nepokretna faza: Kieselgel 60 F₂₅₄ TLC ploča

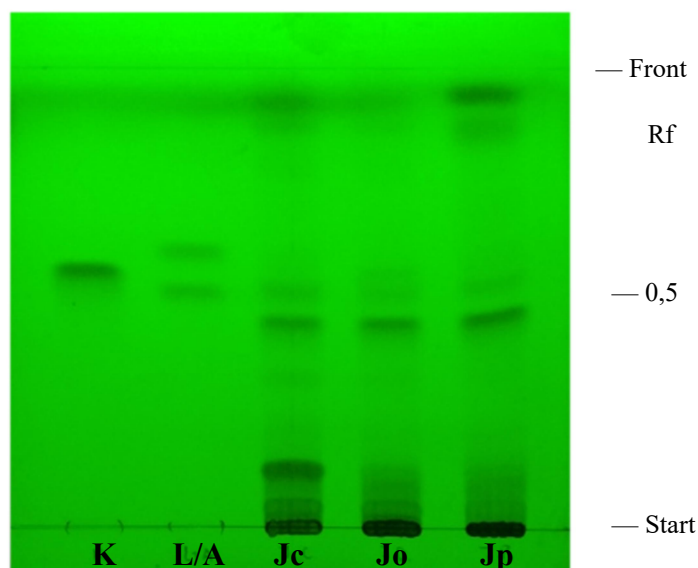
Pokretna faza: etilacetat-mravlja kiselina-voda 8:1:1 (V/V/V)

Detekcija: NST/PEG, UV-365 nm

Metanolni biljni ekstrakti: **Jc** - *J. communis*, **Jo** - *J. oxycedrus*, **Jp** - *J. phoenicea*

Poredbene supstancije: **R** - rutin ($R_F = 0,30$), **Ik** - izokvercitrin ($R_F = 0,58$),
K - kvercitrin ($R_F = 0,75$)

Primjenom smjese toluena, etilformijata i mravlje kiseline u volumnim omjerima 5:4:1 na tankom sloju silikagela provedeno je odjeljivanje flavonoidnih aglikona iz metanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Juniperus*. Pod UV svjetlom na 254 nm u svim biljnim vrstama uočena je zona gašenja fluorescence faktora zaostajanja $R_F = 0,46$ (Slika 14), koja je nakon prskanja NST/PEG reagensom i promatranja ploče pod UV svjetlom na 365 nm fluorescirala narančastožuto (Slika 15). Prema literaturnim podacima ta zona najvjerojatnije pripada amentoflavonu, biflavonoidu karakterističnom za vrste roda *Juniperus* (Keskes i sur., 2017; Taviano i sur., 2013; Ravishankara i sur., 2003). Nadalje, u svim biljnim vrstama uočena je žuta zona s R_F vrijednošću 0,52 koja je bojom i položajem odgovarala luteolinu koji je korišten kao poredbena supstancija. Dobiveni kromatogrami za sve tri istraživane vrste su ukazali na međusobnu sličnost sastava flavonoidnih aglikona.



Slika 14. Zone gašenja fluorescencije na kromatogramu flavonoidnih aglikona u listovima i grančicama vrsta roda *Juniperus*

Nepokretna faza: Kieselgel 60 F₂₅₄ TLC ploča

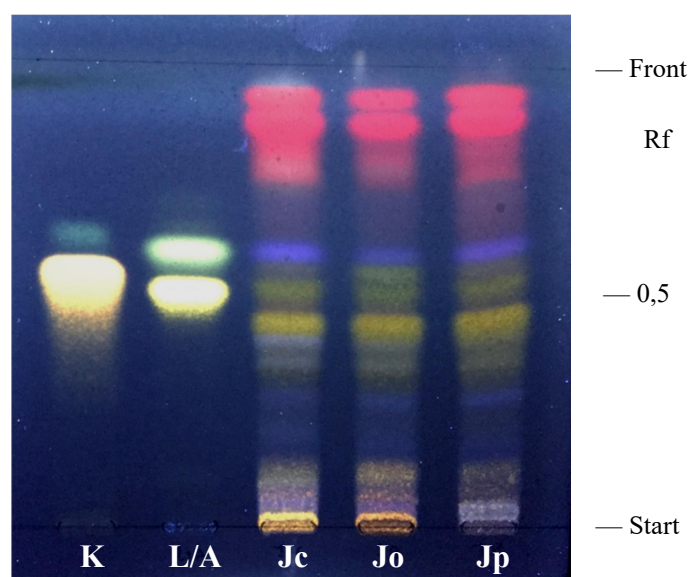
Pokretna faza: toluen-etilformijat-mravljja kiselina 5:4:1 (V/V/V)

Detekcija: UV-254 nm

Metanolni biljni ekstrakti: **Jc** - *J. communis*, **Jo** - *J. oxycedrus*, **Jp** - *J. phoenicea*

Poredbene supstancije: **K** - kvercetin ($R_F = 0,56$), **L** - luteolin ($R_F = 0,52$),

A - apigenin ($R_F = 0,61$)



Slika 15. Kromatogram flavonoidnih aglikona u listovima i grančicama vrsta roda *Juniperus*

Nepokretna faza: Kieselgel 60 F₂₅₄ TLC ploča

Pokretna faza: toluen-etilformijat-mravljja kiselina 5:4:1 (V/V/V)

Detekcija: NST/PEG, UV-365 nm

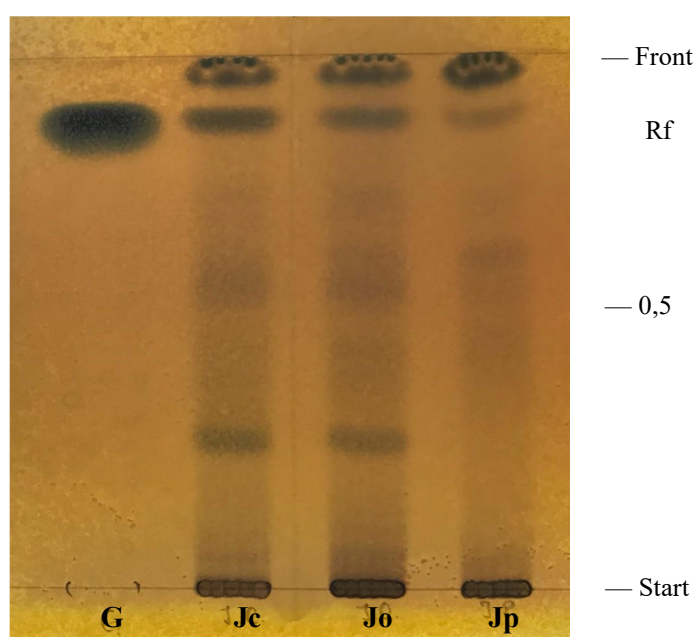
Metanolni biljni ekstrakti: **Jc** - *J. communis*, **Jo** - *J. oxycedrus*, **Jp** - *J. phoenicea*

Poredbene supstancije: **K** - kvercetin ($R_F = 0,56$), **L** - luteolin ($R_F = 0,52$),

A - apigenin ($R_F = 0,61$)

4.1.2. Trjeslovine

Metodom tankoslojne kromatografije ispitana je prisutnost trjeslovina u metanolnim ekstraktima odabranih vrsta roda *Juniperus* primjenom smjese otapala etilformijat-mravlja kiselina-voda 8:1:1 (V/V/V). Odijeljene sastavnice vizualizirane su nakon prskanja ploče željezovim(III) kloridom, a dobiveni kromatogram prikazan je na Slici 16. U svim ekstraktima uočena je tamnosiva zona R_F vrijednosti 0,88 koja je kromatografski odgovarala galnoj kiselini ($R_F = 0,86$). Intezitet detektirane zone bio je najveći u vrsti *J. communis*, a najslabiji u vrsti *J. phoenicea*. Na kromatogramima je detektirano još nekoliko zona slabijeg inteziteta, koje ukazuju na prisutnost trjeslovina u ispitivanim vrstama roda *Juniperus*.



Slika 16. Kromatogram trjeslovina u listovima i grančicama vrsta roda *Juniperus*

Nepokretna faza: Kieselgel 60 F₂₅₄ TLC ploča

Pokretna faza: etilformijat-mravlja kiselina-voda 8:1:1 (V/V/V)

Detekcija: FeCl₃, Vis

Metanolni biljni ekstrakti: **Jc** - *J. communis*, **Jo** - *J. oxycedrus*, **Jp** - *J. phoenicea*

Poredbena supstancija: **G** - galna kiselina ($R_F = 0,86$)

4.2. Sadržaj polifenolnih sastavnica određen spektrofotometrijskim metodama

Kvantitativna fitokemijska analiza različitih skupina polifenolnih sastavnica u listovima i grančicama odabranih vrsta roda *Juniperus* provedena je primjenom odgovarajućih spektrofotometrijskih metoda, te su određeni sadržaji flavonoida, trjeslovina i procijanidina.

4.2.1. Flavonoidi

Sadržaj flavonoida određen je spektrofotometrijskom metodom, u kojoj je potrebno provesti hidrolizu flavonoidnih glikozida, nakon čega se aglikoni odijeljuju izmućkavanjem s etilacetatom. Dodatkom aluminijevog klorida otopini aglikona nastaju žuto obojeni kompleksni spojevi s maksimumom apsorbancije u vidljivom području (425 nm). Sadržaj flavonoida, izražen kao izokvercitrin izračuna se pomoću specifične apsorbancije koja za izokvercitrin iznosi 500. Dobiveni rezultati prikazani u Tablici 2. su pokazali da je sadržaj flavonoida u istraživanim vrstama bio u rasponu 0,40-0,54 %. Najviše flavonoida je određeno u listovima i grančicama vrste *J. communis* (0,54 %), dok je vrsta *J. phoenicea* sadržavala najmanje flavonoida (0,40 %).

Tablica 2. Sadržaj flavonoida u listovima i grančicama vrsta roda *Juniperus*

Biljna vrsta	Flavonoidi (%)
<i>J. communis</i>	0,54 ± 0,001
<i>J. oxycedrus</i>	0,46 ± 0,006
<i>J. phoenicea</i>	0,40 ± 0,008

4.2.2. Ukupni polifenoli i trjeslovine

Određivanje trjeslovina provedeno je spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na određivanju ukupnih polifenola u ekstraktu biljne droge prije i nakon obrade kožnim praškom na koji se vežu trjeslovine. S Folin-Ciocalteuovim reagensom polifenolne sastavnice formiraju plavo obojene kompleksne spojeve, a apsorbancija nastalih plavih otopina mjeri se na 760 nm. Sadržaj trjeslovina, izražen kao pirogalol, određen je iz razlike sadržaja ukupnih polifenola i polifenola neadsorbiranih na kožni prašak. Iz dobivenih rezultata prikazanih u

Tablici 3. vidljivo je da sadržaj ukupnih polifenola u listovima i grančicama odabranih vrsta roda *Juniperus* se kretao od 3,01 % do 3,92 %, dok je udio trjeslovina bio u rasponu od 1,20 % do 1,82 %. Najveći udio ukupnih polifenola sadržavala je vrsta *J. oxycedrus* (3,92 %), dok je najniži udio određen u vrsti *J. communis* (3,01 %). Najviše trjeslovina određeno je vrsti *J. oxycedrus* (1,82 %), dok je vrsta *J. communis* sadržavala najmanje trjeslovina (1,20 %).

Tablica 3. Sadržaj ukupnih polifenola i trjeslovina u listovima i grančicama vrsta roda *Juniperus*

Biljna vrsta	Ukupni polifenoli (%)	Trjeslovine (%)
<i>J. communis</i>	3,01 ± 0,03	1,20 ± 0,01
<i>J. oxycedrus</i>	3,92 ± 0,05	1,82 ± 0,05
<i>J. phoenicea</i>	3,23 ± 0,04	1,64 ± 0,01

4.2.3. Procijanidini

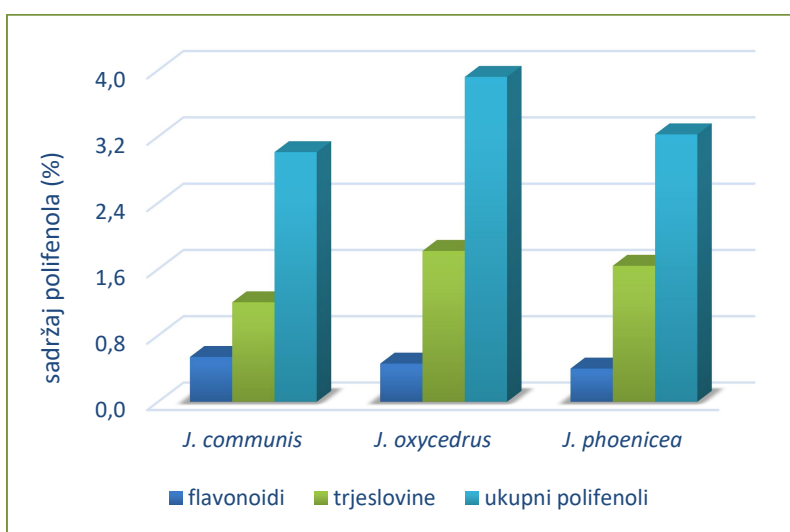
Primjenom spektrofotometrijske metode prema farmakopejskom postupku, udio procijanidina (kondenziranih trjeslovina), kao jedne od dviju podskupina trjeslovina, u listovima i grančicama odabranih vrsta roda *Juniperus*, provodi se ekstrakcijom procijanidina razrijeđenim etanolom. Zatim se ekstrakti podvrgnu zagrijavanju u prisutnosti mineralne kiseline. Oksidativnom depolimerizacijom nastaju flavanolske monomerne jedinice iz kojih se u kiselom mediju stvaraju crveno obojeni cijanidin kationi. Nakon ekstrakcije butanolom, mjeri se apsorbancija otopine na 555 nm, a rezultat se izrazi prema cijanidin kloridu. Sadržaj procijanidina u listovima i grančicama vrsta roda *Juniperus*, prikazan u Tablici 4., bio je u granicama od 0,23 % do 0,36 %. Najveći udio procijanidina (0,36 %) određen je u vrsti *J. phoenicea*, a najmanji u vrsti *J. communis* (0,23 %).

Tablica 4. Sadržaj procijanidina u listovima i grančicama vrsta roda *Juniperus*

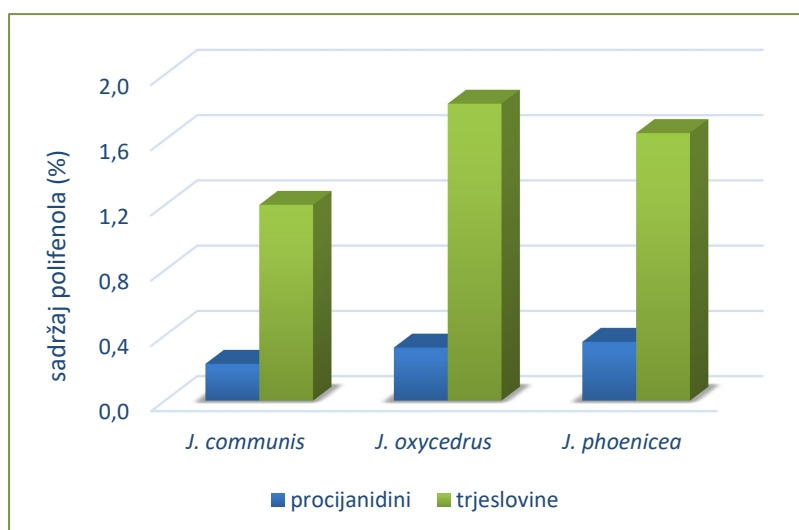
Biljna vrsta	Procijanidini (%)
<i>J. communis</i>	0,23 ± 0,002
<i>J. oxycedrus</i>	0,33 ± 0,001
<i>J. phoenicea</i>	0,36 ± 0,001

4.2.4. Usporedni prikaz sadržaja polifenola

Na Slici 17 i 18 dan je usporedni grafički prikaz sadržaja ukupnih polifenola i različitih skupina polifenolnih sastavnica u listovima i grančicama odabranih vrsta roda *Juniperus*. U vrstama *J. oxycedrus* i *J. phoenicea* određen je veći udio ukupnih polifenola i trjeslovina u odnosu na vrstu *J. communis*, dok je *J. communis* bila bogatiji izvor flavonoida. Udio procijanidina (kondenziranih trjeslovina) također je bio veći u vrstama *J. oxycedrus* i *J. phoenicea*.



Slika 17. Usporedni prikaz sadržaja flavonoida, trjeslovina i ukupnih polifenola (%) u listovima i grančicama vrsta roda *Juniperus*



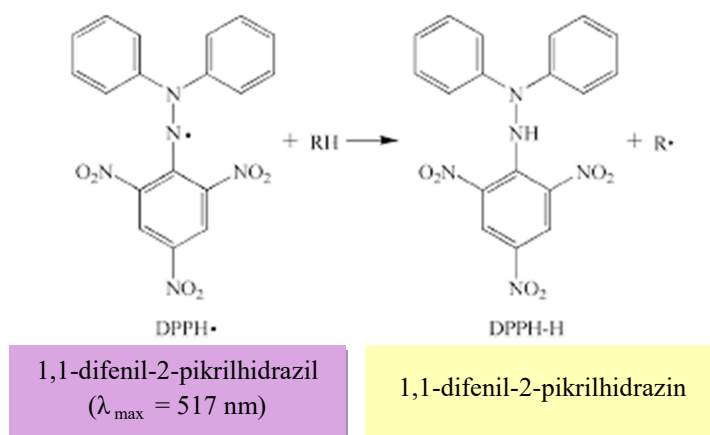
Slika 18. Usporedni prikaz sadržaja procijanidina i trjeslovina (%) u listovima i grančicama vrsta roda *Juniperus*

4.3. Antioksidacijsko djelovanje

U okviru ovog diplomskog rada ispitan je antioksidacijski potencijal etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Juniperus* i referentnog antioksidansa, troloksa, koristeći tri različite spektrofotometrijske metode da bi se mogli pretpostaviti mogući mehanizmi njihovog djelovanja.

4.3.1. Sposobnost hvatanja DPPH radikala

Sposobnost ispitivanih ekstrakata biljnih vrsta roda *Juniperus* da neutraliziraju slobodne radikale određena je spektrofotometrijskom DPPH metodom. Navedena metoda vrlo često se koristi u znanstvenim istraživanjima za vrjednovanje antiradikalne aktivnosti biljnih ekstrakata i njihovih polifenolnih sastavnica. Primjenjeni DPPH[•] (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) je komercijalno dostupan stabilni slobodni radikal koji zbog svog nesparenog elektrona značajno apsorbira u vidljivom dijelu spektra pri valnoj duljini od 517 nm, dajući ljubičasto obojenje. Antioksidansi, donirajući ili atom vodika ili elektron, reduciraju DPPH radikale što dovodi do nastanka stabilnih dijamagnetičnih molekula 1,1-difenil-2-pikrilhidrazina svijetlo žute boje (Slika 19). Antiradikalna aktivnost ispitivanog spoja očituje se obezbojenjem otopine DPPH[•] koje nastaje kao posljedica njegove redukcije. Upravo smanjenje intenziteta obojenja reakcijske smjese očituje se smanjenjem apsorbancije koja se mjeri spektrofotometrijski i direktno je proporcionalna antiradikalnoj aktivnosti ispitivanog uzorka (Kindl i sur., 2015).



Slika 19. Prikaz reakcije DPPH radikala i antioksidansa (preuzeto s <http://pubs.rsc.org/>)

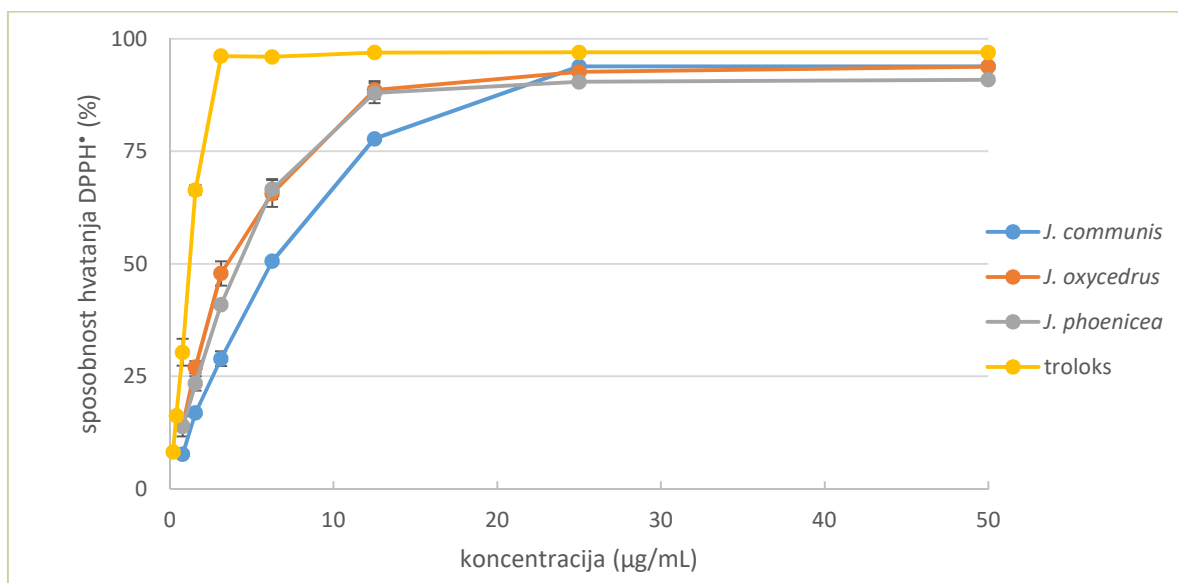
U svrhu ispitivanja antiradikalne aktivnosti ekstrakata biljnih vrsta roda *Juniperus* i referentnog antioksidansa, troloksa, pripremljeni su koncentracijski nizovi razrjeđenja u rasponu od 0,2 µg/mL do 100 µg/mL, a apsorbancija je mjerena na valnoj duljini od 517 nm. Izračunata je inhibicija slobodnih DPPH radikala za pojedine koncentracije uzoraka i izražena je u postocima (%). Iz dobivenih rezultata prikazanih u Tablici 5., vidljivo je da ekstrakti biljnih vrsta roda *Juniperus* posjeduju sposobnost hvatanja DPPH radikala, a utvrđena aktivnost bila je ovisna o primijenjenoj koncentraciji. Aktivnosti ekstrakata u koncentracijama 1,6 µg/mL, 3,1 µg/mL, 6,3 µg/mL i 12,5 µg/mL iznosile su 17-27 %, 29-48 %, 51-67 % i 78-89 %. Pri navedenim koncentracijama najjaču sposobnost hvatanja DPPH[•] imao je ekstrakt biljne vrste *J. oxycedrus* dok je najslabiju aktivnost pokazala vrsta *J. communis*. Pri koncentracijama iznad 25 µg/mL, svi testirani uzorci su ušli u tzv. plato-fazu, što znači da se daljnjim povećanjem koncentracije uzoraka sposobnost hvatanja DPPH radikala nije značajno mijenjala ili je ostala nepromijenjena. Troloks je pokazao bolju aktivnost u odnosu na testirane ekstrakte te je već pri koncentraciji od 1,6 µg/mL neutralizirao više od 50 % slobodnih DPPH radikala, a pri sljedećoj višoj koncentraciji od 3,1 µg/mL njegov učinak je iznosio 96 %.

Tablica 5. Sposobnost hvatanja DPPH[•] etanolnih ekstrakata listova i grančica vrsta roda *Juniperus* i referentnog antioksidansa troloksa

koncentracija (µg/mL)	Sposobnost hvatanja DPPH [•] (%)			
	<i>J. communis</i>	<i>J. oxycedrus</i>	<i>J. phoenicea</i>	troloks
100	92,7 ± 0,0	93,4 ± 0,0	91,6 ± 0,3	–
50	93,9 ± 0,0	93,8 ± 0,0	90,9 ± 0,6	97,0 ± 0,7
25	93,9 ± 0,0	92,7 ± 0,3	90,5 ± 0,6	97,0 ± 0,0
12,5	77,8 ± 1,6	88,6 ± 2,0	88,0 ± 2,3	97,0 ± 0,0
6,3	50,6 ± 0,5	65,6 ± 3,0	66,6 ± 2,3	96,0 ± 0,8
3,1	28,9 ± 0,3	47,9 ± 2,6	40,9 ± 0,6	96,2 ± 0,0
1,6	16,9 ± 1,1	27,0 ± 1,3	23,4 ± 1,6	66,4 ± 1,1
0,8	7,7 ± 0,5	14,0 ± 0,3	13,9 ± 2,3	30,3 ± 2,3
0,4	–	–	–	16,2 ± 0,3
0,2	–	–	–	8,2 ± 0,8

–: nije testirano; Rezultati su izraženi u postocima (%), kao srednja vrijednost ± standardna devijacija triju određivanja

Na Slici 20. dan je grafički prikaz antioksidacijske aktivnosti ekstrakata biljnih vrsta roda *Juniperus* u usporedbi s referentnim antioksidansom. Troloks je već pri niskoj koncentraciji (3,1 µg/mL) postigao svoj maksimalan učinak, dok se antiradikalno djelovanje ekstrakata vrsta roda *Juniperus* približilo učinku troloksa tek pri koncentraciji od 25 µg/mL. Ekstrakti vrsta *J. oxycedrus* i *J. phoenicea* su imali vrlo sličnu aktivnost pri svim testiranim koncentracijama, dok je vrsta *J. communis* pokazala slabije antioksidacijsko djelovanje.

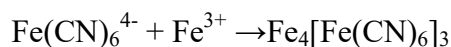
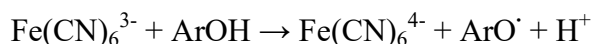


Slika 20. Usporedni grafički prikaz sposobnosti hvatanja DPPH[•] za različite koncentracije etanolnih ekstrakata listova i grančica vrsta roda *Juniperus* i troloksa

4.3.2. Redukcijska sposobnost

Reduktivna svojstva biljnih ekstrakata usko su povezana s njihovom antioksidacijskom moći koja se ostvaruje sa prisustvom reducensa koji otpušta elektrone i na taj način zaustavlja lančane reakcije stvaranja štetnih slobodnih radikala. Također, u reakcijama s određenim prekursorima peroksida, reducirajuće tvari sprječavaju nastanak reaktivnih kisikovih spojeva (Kindl i sur., 2015). S obzirom da se sposobnost redukcije neke tvari može upotrijebiti za vrjednovanje njezinog antioksidacijskog potencijala, u okviru ovog diplomskog rada istražena je redukcijska moć *Juniperus* ekstrakata primjenom metode redukcije kalijevog heksacijanoferata. Redukcijska moć ekstrakata biljnih vrsta roda *Juniperus* je uspoređena s aktivnošću referentnog antioksidansa, troloksa. Primijenjena metoda temeljila se na redukciji željezovog(III) iona u željezo(II) oblik, nastalog u prisutnosti reducensa u reakcijskoj smjesi s kalijevim heksacijanoferatom u kiselom mediju, pri čemu dodatak soli trovalentnog željeza

stvra plavu otopinu (Berlinsko modriilo). Navedena reakcija se može prikazati na sljedeći način:



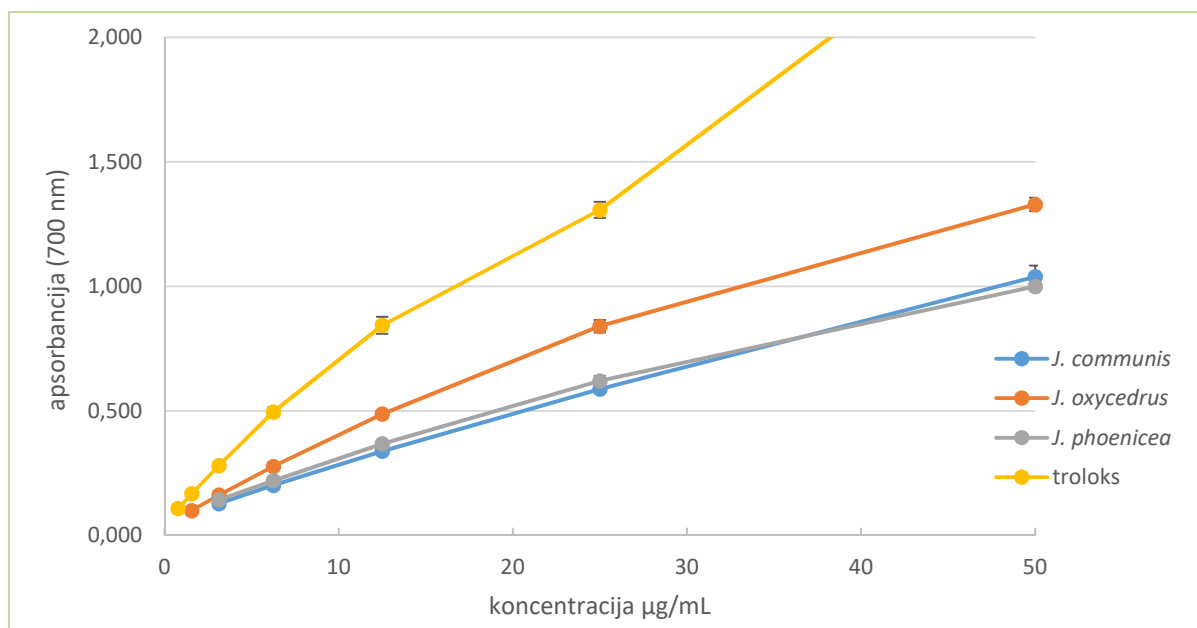
Žuta boja ispitivanih otopina mijenja se u različite nijanse zelene i plave, ovisno o redukcijskoj sposobnosti ispitivanih antioksidansa. Intenzitet obojenja se može kvantificirati spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije na 700 nm. Veće vrijednosti apsorbancija su ukazale na snažniju moć redukcije (Sun i sur., 2011). Ekstrakti su testirani u rasponu koncentracija od 3,1 µg/mL do 100 µg/mL, a učinak troloksa je ispitan u rasponu 0,8-50 µg/mL. Izmjerene vrijednosti apsorbancije pri različitim koncentracijama ekstrakata biljnih vrsta roda *Juniperus* i troloksa prikazane su u Tablici 6. Koncentracije pri kojima su ispitani uzorci postigli vrijednost apsorbancije od 0,5 odgovaraju njihovoj sposobnosti 50 %-tne redukcije. Među testiranim ekstraktima najbolju aktivnost je pokazao ekstrakt vrste *J. oxycedrus* koji je pri koncentraciji od 12,5 µg/mL gotovo dosegao 50 %-tnu učinkovitost. Troloks je pri svim testiranim koncentracijama pokazao jaču redukcijску moć u odnosu na ekstrakte.

Tablica 6. Redukcijska sposobnost etanolnih ekstrakata listova i grančica vrsta roda *Juniperus* i referentnog antioksidansa troloksa

koncentracija (µg/mL)	Sposobnost redukcije iona Fe(III)			
	<i>J. communis</i>	<i>J. oxycedrus</i>	<i>J. phoenicea</i>	troloks
100	1,599 ± 0,115	2,240 ± 0,156	1,594 ± 0,033	–
50	1,039 ± 0,045	1,329 ± 0,027	1,000 ± 0,014	2,615 ± 0,035
25	0,588 ± 0,010	0,841 ± 0,025	0,621 ± 0,020	1,308 ± 0,032
12,5	0,339 ± 0,002	0,488 ± 0,009	0,368 ± 0,010	0,844 ± 0,034
6,3	0,202 ± 0,000	0,278 ± 0,011	0,221 ± 0,004	0,496 ± 0,018
3,1	0,129 ± 0,002	0,163 ± 0,006	0,143 ± 0,000	0,282 ± 0,012
1,6	–	–	–	0,168 ± 0,011
0,8	–	–	–	0,109 ± 0,005

–: nije testirano; Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija triju određivanja.

Slika 21. predstavlja grafički prikaz ovisnosti sposobnosti redukcije iona Fe(III) o primijenjenoj koncentraciji ekstrakata vrsta roda *Juniperus* i referentnog antioksidansa. Pri koncentracijama od 3,1 µg/mL do 50 µg/mL uočena je linearna ovisnost aktivnosti svih testiranih ekstrakata o primijenjenoj koncentraciji ($R^2 = 0,983-0,999$). Iz grafa je vidljivo da su vrste *J. communis* i *J. phoenicea* imale vrlo sličnu sposobnosti redukcije iona željeza(III) pri svim testiranim koncentracijama, dok je ekstrakt vrste *J. oxycedrus* pri koncentracijama većim od 6,3 µg/mL pokazao bolju redukcijsku sposobnost.



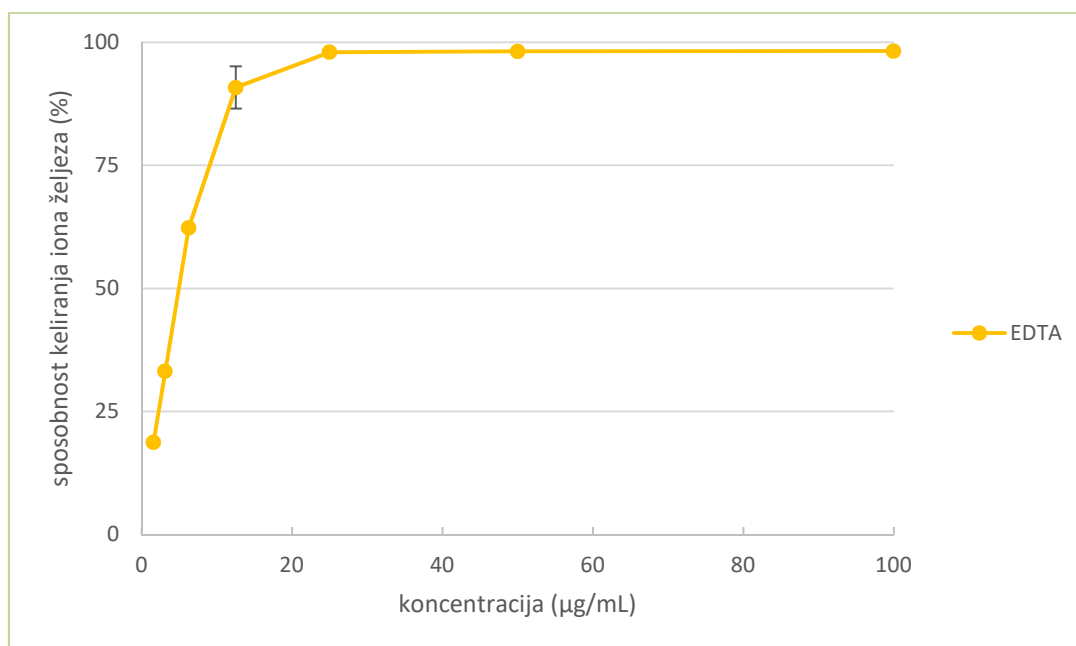
Slika 21. Usporedni grafički prikaz sposobnosti redukcije iona željeza(III) za različite koncentracije etanolnih ekstrakata listova i grančica vrsta roda *Juniperus* i troloksa

4.3.3. Kelirajuća aktivnost

Ioni željeza(II) i bakra(I) su ioni prijelaznih metala koji pokazuju izravno prooksidativno djelovanje katalizirajući stvaranje visoko reaktivnih kisikovih spojeva. Zbog svoje visoke reaktivnosti željezo je najvažniji prooksidans lipidne oksidacije. U obliku Fe^{2+} iona reagira s vodikovim peroksidom, pri čemu dolazi do Fentonove reakcije u kojoj nastaje hidroksilni radikal ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^-$), koji ima izraženu sposobnost uzrokovanja lipidne peroksidacije u organizmu. Nadalje, željezo reagira i s lipidnim hidroperoksidima dajući reaktivne lipidne alkoksilne radikale koji dalje mogu sudjelovati u širenju oksidativnih oštećenja lipida ($Fe^{2+} + LOOH \rightarrow Fe^{3+} + LO^{\bullet} + OH^-$) (Štefan i sur., 2007). Kompleksacija

metalnih iona predstavlja jedan od mogućih mehanizama antioksidacijskog djelovanja polifenola.

Sposobnosti *Juniperus* ekstrakata da keliraju ione željeza(II) provodi se kolorimetrijskom metodom s ferozinom koji kvantitativno stvara komplekse s Fe^{2+} , pri čemu nastaje ružičasto obojeni kompleks. Ukoliko su prisutni kelatori u reakcijskoj smjesi, sprječiti će se nastajanje kompleksa ferozina s Fe^{2+} . Kelirajuća svojstva ispitivanih tvari mogu se procijeniti na temelju smanjenja intenziteta obojenja reakcijske smjese. Nakon mjerenja apsorbancija reakcijskih smjesa na 562 nm, izračunata je inhibicija formiranja ferozin- Fe^{2+} kompleksa za pojedine koncentracije uzoraka i izražena je u postotcima (%). Dobiveni rezultati su pokazali da ispitivani biljni ekstrakti, u koncentracijskom nizu 50-400 $\mu\text{g/mL}$, ne posjeduju sposobnost keliranja iona željeza(II). Samo pri najvećoj testiranoj koncentraciji od 800 $\mu\text{g/mL}$ vrste *J. oxycedrus* i *J. communis* su ostvarile vrlo slab učinak od 33 % i 6 %. Usporedno je provedeno ispitivanje EDTA kao referentnog kelatora, a dobiveni rezultati su prikazani na Slici 22. EDTA je pri koncentraciji od 6,3 $\mu\text{g/mL}$ kelirao više od 50 % iona željeza(II), dok je pri sljedećoj višoj koncentraciji (12,5 $\mu\text{g/mL}$) njegov učinak iznosio 91 %. Izračunata IC_{50} vrijednost za EDTA iznosila je $4,9 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$.



Slika 22. Grafički prikaz sposobnosti keliranja iona željeza (II) EDTA

4.3.4. Usporedna antioksidacijska aktivnost etanolnih ekstrakata vrsta roda

Juniperus

U ovom diplomskom radu istraženo je antioksidacijsko djelovanje ekstrakata odabranih vrsta roda *Juniperus*, u usporedbi s troloksom, kao referentnim antioksidansom. Određena je sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala te sposobnost redukcije iona željeza(III). U Tablici 7. prikazan je usporedni prikaz izračunatih IC₅₀ vrijednosti za primjenjene metode, koje se najčešće koriste za procjenu antioksidacijskog učinka, a označavaju koncentraciju ispitivane tvari pri kojoj se ostvaruje 50 %-tni učinak. Utvrđene IC₅₀ vrijednosti *Juniperus* ekstrakata primjenom DPPH metode bile su u rasponu od 3,4 µg/mL do 6,2 µg/mL, a njihova učinkovitost je bila u sljedećem opadajućem nizu: *J. oxycedrus*, *J. phoenicea* i *J. communis*. Vrsta *J. oxycedrus* (IC₅₀ = 13,7 µg/mL) je pokazala bolja redukcijska svojstva od ostala dva testirana ekstrakata s IC₅₀ vrijednostima 21,5 µg/mL i 21,0 µg/mL koje se nisu statistički značajno razlikovale. Dobivene IC₅₀ vrijednosti su ukazale da ekstrakti odabranih vrsta roda *Juniperus* posjeduju dobra antioksidacijska svojstva temeljena na sposobnosti inhibicije štetnih slobodnih radikala i moći redukcije, iako je njihov učinak bio nešto slabiji u odnosu na referentni antioksidans, troloks. Među testiranim ekstraktima vrsta roda *Juniperus* najbolju 50 %-tnu antiradikalnu aktivnost i 50 %-tnu redukcijsku moć je ostvario ekstrakt vrste *J. oxycedrus*.

Tablica 7. Usporedni prikaz IC₅₀ vrijednosti etanolnih ekstrakata listova i grančica vrsta roda *Juniperus* i referentnog antioksidansa troloksa

učinak	IC ₅₀ * (µg/mL)			
	<i>J. communis</i>	<i>J. oxycedrus</i>	<i>J. phoenicea</i>	troloks
Sposobnost hvatanja DPPH*	6,2 ± 0,1 ^a	3,4 ± 0,4 ^b	4,2 ± 0,1 ^c	1,2 ± 0,1 ^d
Redukcijska sposobnost	21,5 ± 0,7 ^a	13,7 ± 0,5 ^b	21,0 ± 0,6 ^a	6,8 ± 0,3 ^c

*IC₅₀ vrijednost – koncentracija koja osigurava 50 %-tno hvatanje slobodnih DPPH radikala, odnosno koncentracija pri kojoj je izmjerena apsorbancija 0,5 za redukcijsku moć. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost ± standardnu devijaciju triju neovisnih određivanja. Srednje vrijednosti unutar retka označene različitim slovom se međusobno statistički značajno razlikuju ($P < 0,05$).

5. ZAKLJUČCI



U okviru ovog diplomskog rada provedeno je istraživanje fitokemijskog sastava i antioksidacijskog učinaka polifenolnih sastavnica u listovima i grančicama odabranih vrsta roda *Juniperus* (*J. communis*, *J. oxycedrus* i *J. phoenicea*) hrvatske flore.

Prisutnost flavonoida i trjeslovina u metanolnim ekstraktima odabranih vrsta roda *Juniperus* dokazana je tankoslojnom kromatografijom visoke djelotvornosti. Dokazana je prisutnost kvercetinskih glikozida te je uočeno da su vrste *J. communis* i *J. oxycedrus* bogat izvor rutina. Ustanovljeno je da vrsta *J. oxycedrus* ima sličan sastav flavonoidnih glikozida u odnosu na običnu borovicu, dok se vrsta *J. phoenicea* razlikuje.

Primjenom različitih spektrofotometrijskih metoda utvrđeno je da su listovi i grančice ispitanih vrsta roda *Juniperus* bogat izvor polifenolnih spojeva te da sadrže 3,0-3,9 % ukupnih polifenola među kojima je 0,4-0,5 % flavonoida i 1,2-1,8 % trjeslovina, od toga 0,2-0,4 % procijanidina. U vrstama *J. oxycedrus* i *J. phoenicea* određen je veći udio ukupnih polifenola, trjeslovina i procijanidina u odnosu na vrstu *J. communis*, dok je obična borovica bila bogatiji izvor flavonoida.

Antioksidacijski učinak etanolnih ekstrakata vrsta roda *Juniperus* istražen je primjenom tri različite spektrofotometrijske metode u usporedbi s troloksom kao referentnim antioksidansom. Istraživanim biljnim ekstraktima ustanovljena je sposobnost hvatanja DPPH radikala (IC_{50} : 3,4-6,2 $\mu\text{g/mL}$) i redukcije iona željeza(III) (IC_{50} : 13,7-21,5 $\mu\text{g/mL}$). U testiranim koncentracijama ekstrakti nisu pokazali značajnu sposobnost keliranja iona željeza(II). Utvrđeno je da su ekstrakti vrsta *J. oxycedrus* i *J. phoenicea* imali bolju sposobnost hvatanja DPPH radikala u odnosu na običnu borovicu (*J. communis*). Najveću redukcijsku sposobnost pokazao je ekstrakt vrste *J. oxycedrus* dok se učinak drugih dviju vrsta nije statistički značajno razlikovao.

Istraživanja provedena u okviru ovog diplomskog rada su ukazala na vrste roda *Juniperus* kao bogat izvor polifenola te na njihov potencijal u prevenciji i liječenju oboljenja u čijoj je podlozi oksidacijski stres. Dobiveni rezultati pružaju nove znanstvene spoznaje o bioaktivnim sastavnicama odabranih vrsta roda *Juniperus* hrvatske flore.

6. LITERATURA



- Aboul-Ela M, El-Shaer N, Abd El-Azim T. Chemical constituents and antihepatotoxic effect of the berries of *Juniperus Phoenicea* Part II. *Nat Prod Sci*, 2005, 11, 240-247.
- Alqasoumi SI, Farraj AI, Saad Abdel-Kader M. Study of the hepatoprotective effect of *Juniperus phoenicea* constituents. *Pak J Pharm Sci*, 2013, 26, 999-1008.
- Blažeković B, Stanić G, Vladimir-Knežević S. Morfološko-anatomska i fitokemijska obilježja biljnih vrsta *Thymus vulgaris* L. i *Thymus pulegioides* L.. *Farm Glas*, 2006; 62, 121-130.
- Bruneton J. Pharmacognosy (Phytochemistry, Medicinal Plants), Paris-New York-London, Editions TEC & DOC, Lavoisier Publishing, Intercept, 1999, str. 370-388.
- Chaouche TM, Haddouchi F, Ksouri R, Medini F, Atik-Bekara F. *In vitro* evaluation of antioxidant activity of the hydro-methanolic extracts of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*. *Phytothérapie*, 2013, 11, 244-249.
- Chen J, Mangelinckx S, Adams A, Wang ZT, Li WL, De Kimpe N. Natural flavonoids as potential herbal medication for the treatment of diabetes mellitus and its complications. *Nat Prod Commun*, 2015, 10, 187-200.
- Dane Y, Mouhouche F, Canela-Garayoa R, Delpino-Rius A. Phytochemical analysis of methanolic extracts of *Artemisia absinthium* L. 1753 (Asteraceae), *Juniperus phoenicea* L., and *Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast, 1892 (Cupressaceae) and evaluation of their biological activity for stored grain protection. *Arab J Sci Eng*, 2016, 41, 2147-2158.
- Domac R. Flora Hrvatske, Zagreb: Školska knjiga, 2002, str. 25-26.
- EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care). European Pharmacopoeia, 9. izd., Strasbourg: Council of Europe, 2018, str. 288., 1376-1378., 1384-1385.
- El Jemli M, Kamal R, Marmouzi I, Zerrouki A, Cherrah Y, Alaoui K. Radical-scavenging activity and ferric reducing ability of *Juniperus thurifera* (L.), *J. oxycedrus* (L.), *J. phoenicea* (L.) and *Tetraclinis articulata* (L.). *Adv Phar Sc*, 2016, 2016, ID 6392656, 6 str.
- EMA/HMPC (European Medicines Agency/Committee on Herbal Medicinal Products). EMA/HMPC/441930/2008 - Assessment report on *Juniperus communis* L., pseudofructus. <http://www.ema.europa.eu>, pristupljeno 1. 5. 2018.
- EMA/HMPC (European Medicines Agency/Committee on Herbal Medicinal Products). EMA/HMPC/12401/2010- Assessment report on *Juniperus communis* L., aetheroleum. <http://www.ema.europa.eu>, pristupljeno 1. 5. 2018.

- Fierascu I, Ungureanu C, Avramescu SM, Cimpeanu C, Georgescu MI, Fierascu RC, Ortan A, Sutan AN, Anuta V, Zanfirescu A, Dinu-Pirvu CE, Velescu BS. Genoprotective, antioxidant, antifungal and anti-inflammatory evaluation of hydroalcoholic extract of wild-growing *Juniperus communis* L. (Cupressaceae) native to Romanian southern sub-Carpathian hills. *BMC Complement Altern Med*, 2018, 18, 14. str.
- Forenbacher S. Velebit i njegov biljni svijet. Zagreb, Školska knjiga, 1990, str. 324-327.
- Juniperus communis* L., 2018., <http://www.euforgen.org>, pristupljeno 16. 3. 2018.
- Juniperus oxycedrus* L., 2018., <https://www.plantea.com.hr>, pristupljeno 16. 3. 2018
- Juniperus phoenicea* L., 2018., <https://www.plantea.com.hr>, pristupljeno 16. 3. 2018
- Karaman İ, Şahin F, Güllüce M, Ögütçü H, Şengül M, Adıgüzel A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *J Ethnopharmacol*, 2003, 85, 231-235.
- Kaštelan-Macan M, Medić-Šarić M, Turina S. Plošna kromatografija, Zagreb: Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2006, str. 51.
- Keskes H, Belhadj S, Jlail L, El Feki A, Damak M, Sayadi S, Allouche N. LC-MS–MS and GC-MS analyses of biologically active extracts and fractions from Tunisian *Juniperus phoenicea* leaves. *Pharm Biol*, 2017, 55, 88-95.
- Kindl M, Blažeković B, Bucar F, Vladimir-Knežević S. Antioxidant and anticholinesterase potential of six *Thymus* species. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015, ID 403950, 10 str.
- Kovačić S, Nikolić T, Ruščić M, Milović M, Stamenković V, Mihelj D, Jasprica N, Bogdanović S, Topić J. Flora jadranske obale i otoka, Zagreb, Školska knjiga, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2008, str. 48-51.
- Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Sci World J*, 2013, 2013, ID 162750, 16 str.
- Laouar A, Klibet F, Bourogaa E, Benamara A, Boumendjel A, Chefrour A, Messarah M. Potential antioxidant properties and hepatoprotective effects of *Juniperus phoenicea* berries against CCl₄ induced hepatic damage in rats. *Asian Pac J Trop Med*, 2017, 10, 263-269.
- Lesjak MM, Beara IN, Orčić DZ, Knežević NP, Simin NĐ, Svirčev ĐE, Mimica-Dukić NM. Phytochemical composition and antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activities of *Juniperus macrocarpa* Sibth. et Sm. *J Funct Food*, 2014, 7, 257-268.

- Orhan N, Akkol E, Ergun F. Evaluation of antiinflammatory and antinociceptive effects of some *Juniperus* species growing in Turkey. *Turk J Biol*, 2012, 36, 719-726.
- Orhan N, Berkkanb A, Deliorman Orhana D, Aslana M, Erguna F. Effects of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* on tissue lipid peroxidation, trace elements (Cu, Zn, Fe) and blood glucose levels in experimental diabetes. *J Ethnopharmacol*, 2011, 133, 759-764.
- Orhan N, Hoşbaş S, Deliorman Orhan D, Aslan M, Ergun F. Enzyme inhibitory and radical scavenging effects of some antidiabetic plants of Turkey. *Iran J Basic Med Sci*, 2014, 17, 426-432.
- Öztürk M, Tümen İ, Uğur A, Aydoğmuş-Öztürk F, Topçu G. Evaluation of fruit extracts of six Turkish *Juniperus* species for their antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activities. *J Sci Food Agric*, 2011, 91, 867-876.
- Prikaz reakcije DPPH radikala i antioksidansa, 2018., <http://pubs.rsc.org>, pristupljeno 20. 4. 2018.
- Ravishankara MN, Pillai AD, Padh H, Rajani M. A sensitive HPTLC method for estimation of amentoflavone, a bioactive principle from *Biophytum sensitivum* (Linn.) DC. and *Putranjiva roxburghii* Wall. *JPC J Planar Chromat*, 2003, 16, 201-205.
- Romano B, Pagano E, Montanaro V, Fortunato AL, Milic N, Borrelli F. Novel insights into the pharmacology of flavonoids. *Phytother Res*, 2013, 27, 1588-1596.
- Sahin Yaglioglu A, Eser F. Screening of some *Juniperus* extracts for the phenolic compounds and their antiproliferative activities. *S Afr J Bot*, 2017, 113, 29-33.
- Serrano J, Puupponen-Pimiä R, Dauer A, Aura A-M, Saura-Calixto F. Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Mol Nutr Food Res*, 2009, 53, 2:S310-329.
- Sun L, Zhang J, Lu X, Zhang L, Zhang Y. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. *Food Chem Toxicol*, 2011, 49, 2689-2696.
- Štefan L, Tepšić T, Zavidović T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. Lipidna peroksidacija - uzroci i posljedice. *Medicina*, 2007, 43, 84-93.
- Tavares L, McDougall GJ, Fortalezas S, Stewart D, Ferreira RB, Santos CN. The neuroprotective potential of phenolic-enriched fractions from four *Juniperus* species found in Portugal. *Food Chem*, 2012, 135, 562-570.

- Taviano MF, Marino A, Trovato A, Bellinghieri V, Melchini A, Dugo P, Cacciola F, Donato P, Mondello L, Güvenç A, De Pasquale R, Miceli N. *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus* and *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *macrocarpa* (Sibth. & Sm.) Ball. “berries” from Turkey: Comparative evaluation of phenolic profile, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities. *Food Chem Toxicol*, 2013, 58, 22-29.
- Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA. *Flora Europaea*, Vol 3., Cambridge, Cambridge University Press, 1972, str. 38-39.
- Vasiljević B, Knežević-Vukčević J, Mitić-Ćulafić D, Orčić D, Francisković M, Srdic-Rajic T, Jovanović M, Nikolić B. Chemical characterization, antioxidant, genotoxic and *in vitro* cytotoxic activity assessment of *Juniperus communis* var. *saxatilis*. *Food Chem Toxicol*, 2018, 112, 118-125.
- Vladimir-Knežević S, Blažeković B, Bival Štefan M, Babac M. Plant polyphenols as antioxidants influencing the human health. U: *Phytochemicals as nutraceuticals - global approaches to their role in nutrition and health*. Venketeshwer Rao A, urednik, Rijeka, InTech, 2012, str. 155-158.
- Wagner H, Bladt S. *Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas*, 2. izd., Berlin-Heidelberg: Springer, 2009, str. 195-197., 362.
- Wichtl M. *Herbal drugs and phytopharmaceuticals*, 3. izd., Stuttgart, Medpharm Scientific Publishers, 2004, str. 320-323.
- Wojciak-Kosior M, Oniszczyk A. Sample preparation and TLC analysis of phenolic acids. U: *Thin layer chromatography in phytochemistry*. Waksmundzka-Hajnos M, Sherma J, Kowalska T, urednici, Boca Raton: CRC Press, 2008, str. 331-364.
- Zhang J, Li L, Kim S-H, Hagerman AE, Lü J. Anti-cancer, anti-diabetic and other pharmacologic and biological activities of penta-galloyl-glucose. *Pharm Res*, 2009, 26, 2066-2080.

7. SAŽETAK/SUMMARY



U okviru ovog diplomskog rada istražen je fitokemijski sastav i antioksidacijski učinak polifenolnih sastavnica u etanolnim ekstraktima listova i grančica odabranih vrsta roda *Juniperus* iz hrvatske flore (*J. communis*, *J. oxycedrus* i *J. phoenicea*). Metodom tankoslojne kromatografije visoke djelotvornosti dokazana je prisutnost flavonoida i trjeslovina te su vrste *J. communis* i *J. oxycedrus* istaknute kao bogat izvor rutina. Primjenom različitih spektrofotometrijskih metoda određeno je da listovi i grančice istraživanih vrsta sadrže 3,0-3,9 % ukupnih polifenola među kojima 0,4-0,5 % flavonoida i 1,2-1,8 % trjeslovina, od toga 0,2-0,4 % procijanidina. Antioksidacijski učinak etanolnih ekstrakata ispitan je različitim spektrofotometrijskim metodama u usporedbi s troloksom. Utvrđeno je da ekstrakti odabranih biljnih vrsta posjeduju sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala (IC_{50} : 3,4-6,2 $\mu\text{g/mL}$) i redukcije iona željeza(III) (IC_{50} : 13,7-21,5 $\mu\text{g/mL}$). Dobiveni rezultati pokazuju da su istraživane vrste roda *Juniperus* bogat izvor polifenolnih spojeva koji vrlo vjerojatno doprinose utvrđenoj antioksidacijskoj aktivnosti njihovih etanolnih ekstrakata.

The phytochemical composition and the antioxidant activity of polyphenols in the ethanolic extracts of leaves and branches of selected *Juniperus* species from the Croatian flora (*J. communis*, *J. oxycedrus* and *J. phoenicea*) were studied in this thesis. Flavonoids and tannins were detected with high-performance thin-layer chromatography. Moreover, *J. communis* and *J. oxycedrus* were found to be a rich source of rutin. The content of 3.0-3.9 % of total polyphenols in the leaves and branches, as well as 0.4-0.5 % of flavonoids and 1.2-1.8 % of tannins (out of which 0.2-0.4 % of procyanidins) among them, was determined spectrophotometrically. The antioxidant activity of the ethanolic extracts was tested by using various spectrophotometric methods in comparison with trolox. Our study revealed that tested extracts possessed DPPH free-radical scavenging activity (IC_{50} : 3.4-6.2 $\mu\text{g/mL}$), as well as ferric reducing ability (IC_{50} : 13.7-21.5 $\mu\text{g/mL}$). According to the results, the investigated species of the *Juniperus* genus are a rich source of polyphenolic compounds which most likely contribute to the confirmed antioxidant activity of their ethanolic extracts.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmakognoziju
Trg Marka Marulića 20/II, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

ANTIOKSIDACIJSKO DJELOVANJE ETANOLNIH EKSTRAKATA ODABRANIH VRSTA RODA *JUNIPERUS*

Ana-Marija Plećaš

SAŽETAK

U okviru ovog diplomskog rada istražen je fitokemijski sastav i antioksidacijski učinak polifenolnih sastavnica u etanolnim ekstraktima listova i grančica odabranih vrsta roda *Juniperus* iz hrvatske flore (*J. communis*, *J. oxycedrus* i *J. phoenicea*). Metodom tankoslojne kromatografije visoke djelotvornosti dokazana je prisutnost flavonoida i trjeslovina te su vrste *J. communis* i *J. oxycedrus* istaknute kao bogat izvor rutina. Primjenom različitih spektrofotometrijskih metoda određeno je da listovi i grančice istraživanih vrsta sadrže 3,0-3,9 % ukupnih polifenola među kojima 0,4-0,5 % flavonoida i 1,2-1,8 % trjeslovina, od toga 0,2-0,4 % procijanidina. Antioksidacijski učinak etanolnih ekstrakata ispitan je različitim spektrofotometrijskim metodama u usporedbi s troloksom. Utvrđeno je da ekstrakti odabranih biljnih vrsta posjeduju sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala (IC₅₀: 3,4-6,2 µg/mL) i redukcije iona željeza(III) (IC₅₀: 13,7-21,5 µg/mL). Dobiveni rezultati pokazuju da su istraživane vrste roda *Juniperus* bogat izvor polifenolnih spojeva koji vrlo vjerojatno doprinose utvrđenoj antioksidacijskoj aktivnosti njihovih etanolnih ekstrakata.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 50 stranica, 22 grafička prikaza, 7 tablica i 45 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Juniperus communis*, *Juniperus oxycedrus*, *Juniperus phoenicea*, flavonoidi, trjeslovine, antioksidacijsko djelovanje

Mentor: **Dr. sc. Marija Kindl**, viša asistentica-poslijedoktorandica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Marija Kindl**, viša asistentica-poslijedoktorandica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Maja Bival Štefan, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Jasna Jablan, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: svibanj 2018.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmacognosy
Trg Marka Marulića 20/II, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diploma thesis

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ETHANOLIC EXTRACTS OF SELECTED *JUNIPERUS* SPECIES

Ana-Marija Plećaš

SUMMARY

The phytochemical composition and the antioxidant activity of polyphenols in the ethanolic extracts of leaves and branches of selected *Juniperus* species from the Croatian flora (*J. communis*, *J. oxycedrus* and *J. phoenicea*) were studied in this thesis. Flavonoids and tannins were detected with high-performance thin-layer chromatography. Moreover, *J. communis* and *J. oxycedrus* were found to be a rich source of rutin. The content of 3.0-3.9 % of total polyphenols in the leaves and branches, as well as 0.4-0.5 % of flavonoids and 1.2-1.8 % of tannins (out of which 0.2-0.4 % of procyanidins) among them was determined spectrophotometrically. The antioxidant activity of the ethanolic extracts was tested by using various spectrophotometric methods in comparison with trolox. Our study revealed that tested extracts possessed DPPH free-radical scavenging activity (IC₅₀: 3.4-6.2 µg/mL), as well as ferric reducing ability (IC₅₀: 13.7-21.5 µg/mL). According to the results, the investigated species of the *Juniperus* genus are a rich source of polyphenolic compounds which most likely contribute to the confirmed antioxidant activity of their ethanolic extracts.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 50 pages, 22 figures, 7 tables and 45 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Juniperus communis*, *Juniperus oxycedrus*, *Juniperus phoenicea*, flavonoids, tannins, antioxidant activity

Mentor: **Marija Kindl, Ph.D.** Assistant-postdoctorand, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Marija Kindl, Ph.D.** Assistant-postdoctorand, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Maja Bival Štefan, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Jasna Jablan, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: May 2018.